FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

N° 3

SUR LA PURIFICATION DES 17-CETOSTEROIDES URINAIRES PAR SUBLIMATION

THÈSE

présentée et publiquement soutenue

devant la Faculté de Pharmacie de Marseille

MAI 1971

par

Madame THAN-TRONG THUY-MAI

née le 30 novembre 1940 à THANH-HOA (Viet-Nam)

Pharmacien

Docteur ès-Sciences d'Université - Paris

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse	MM. les Professeurs	J.-C. DUMAZERT	Président
	»	F. PELLISSIER	
	»	R. BARET	Assesseurs
	»	C. GHIGLIONE	

LINO-IMP - MARSEILLE

Madame THAN-TRONG THUY-MAI

Pharmacien

Docteur ès-Sciences d'Université - Paris

SUR LA PURIFICATION DES 17-CETOSTEROIDES URINAIRES PAR SUBLIMATION

Travail du Laboratoire de Chimie
de la Faculté de Pharmacie de Marseille

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTE DE PHARMACIE DE MARSEILLE

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen : C. GREBUS

Assesseurs : J. PASTOR, A. CREVAT

Attaché Principal, Responsable des Services administratifs: P. MOUCHET

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs honoraires

MM. MERCIER, VIGNOLI

Professeurs titulaires

Botanique et cryptogamie	MM. PELLISSIER
Chimie	DUMAZERT
Chimie analytique et hydrologie	PASTOR
Chimie biologique	REYNAUD
Chimie générale	BARET
Chimie minérale	MOURGUE
Pharmacie chimique et Législation pharmaceutique	CRISTAU
Pharmacie galénique et Matière médicale	BERNARD P.
Pharmacologie pharmaceutique	MERCIER J.
Physique	CREVAT
Toxicologie	VIALA
Zoologie et Microbiologie	GREBUS

Professeurs sans Chaire

MM. GHIGLIONE, LANZA M.

Maître de Conférences agrégé honoraire

M. GUILLOT J.

Maîtres de Conférences agrégés

Mlle CREMIEUX	MM. GOUEZO
MM. ARNOUX A.	REGLI
GAYTE-SORBIER	SOYFER

A MON JURY DE THESE

Hommage de ma respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J.-C. DUMAZERT

Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui m'a permis de soutenir cette thèse en souvenir des indéfectibles liens d'amitié qui le lie à mes compatriotes.

et à Messieurs les Professeurs :

F. PELLISSIER

Chevalier de la Légion d'Honneur

R. BARRET et C. GHIGLIONE

Avec mes remerciement les plus vifs pour l'honneur qu'il me font en jugeant mon travail.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545820_0014

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE TRUONG VAN CHOM

ex-Doyen de la Faculté de Pharmacie de Saïgon

Pour l'intérêt tout particulier qu'il a bien voulu porter à mes études depuis mon entrée à la Faculté, et pour les précieux conseils qu'il n'a jamais cessé de me prodiguer, tant pour mes études que pour mon travail, et notamment pour la préparation de la présente thèse de Doctorat qui, sans lui, n'aurait pas pu voir le jour.

Hommage de ma profonde gratitude.

A MES MAITRES, de la Faculté de Pharmacie de SAIGON :

MM. NGUYEN VINH NIEN
VU NGOC TRAN
NGUYEN VAN TRANG
NGUYEN MANH HUNG
TO DONG
VU HUNG
LA THANH TRUNG

Hommage de ma reconnaissance.

A LA MEMOIRE DE MON GRAND-PERE

A MA GRAND-MERE

Avec ma respectueuse affection.

A MES PARENTS, Monsieur et Madame THAN-TRONG LAC

Je dédie ce travail, élaboré sur leurs conseils et poursuivi avec leurs encouragements et leur constante sollicitude.

En hommage de ma totale affection et de ma profonde gratitude.

A MON MARI, Monsieur DAO-HUU GIAO

Docteur ès Sciences Physiques

Pharmacien d'Etat

Avec mon amour entier.

A MES ENFANTS

DAO-THUY HUONG

DAO-TRONG HUNG

DAO-TRONG DZUNG Walter

Avec toute mon affection, et en espérant qu'ils suivront l'exemple de leurs parents.

A MA TANTE, Madme VU-TI PHUONG

Qui a toujours témoigné à mon égard de la plus bienveillante sollicitude.

Hommage de ma profonde reconnaissance et de toute mon affection.

A MA SŒUR, Madame THAN-TRONG THUY-LAN

A MON BEAU-FRERE, Docteur NGUYEN-SON HUNG

Avec ma profonde affection.

A MON PETIT FRERE THAN-TRONG THUY-LIEN

Avec ma profonde affection et en espérant qu'il aura un brillant avenir dans le domaine scientifique.

A MA TANTE, Madame THAN-THI NGOC-QUE

A MON ONCLE, Docteur DUONG-CAM CHUONG

Dont l'intérêt à mon égard ne s'est jamais départi depuis ma naissance.

Témoignage de ma reconnaissance et de toute mon affection.

A MES ONCLES ET TANTES

A MES COUSINS ET COUSINES

Avec toute mon affection.

A MES BEAUX-PARENTS

A MES BEAUX-FRERES ET MES BELLES-SŒURS

Avec toute mon affection.

A MES AMIS

A MES COLLABORATEURS DE LA S.I.F.A.P.P.

Avec toutes mes amitiés.

INTRODUCTION

I. — DONNEES CHIMIQUES SUR LES HORMONES STEROIDES

A) Structure chimique sur les 17-cétostéroïdes

Au point de vue chimique, les 17-cétostéroïdes dérivent du cyclopentanophénanthrène ou gonane, hydrocarbure polycyclique saturé à 17 atomes de carbone. Quatre cycles entrent dans la composition du gonane ; trois d'entre eux (A, B, C) sont de nature cyclohexanique, le quatrième (D) appartient à la série cyclopentanique. Tous les atomes de carbone portent un numéro précisant leur position.

Les stéroïdes hormonaux ayant des groupements méthyl (CH_3—) fixés sur les carbones —10 et —13, tels les androgènes, possèdent le noyau de l'androstane (Schémas 4 et 5, figure n° 1).

La différence existant entre les 17-cétostéroïdes naturels, extraits des urines humaines, repose sur la position de l'hydrogène fixé sur le carbone —5. Si l'on ajoute que les groupements méthyl angulaires sont toujours du même côté du plan moyen de la molécule, on conçoit qu'ils soient pris comme points de repère. Donc deux positions sont permises à l'atome d'hydrogène. Il peut être en trans par rapport aux méthyl angulaires, l'ensemble de la molécule a une configuration spatiale voisine d'un plan : la série correspondante est dite 5 α ou allo. Il peut être en cis, ce qui correspond à une distorsion du cycle A par rapport au plan moyen de la molécule : la série est dite alors 5 β ou étio.

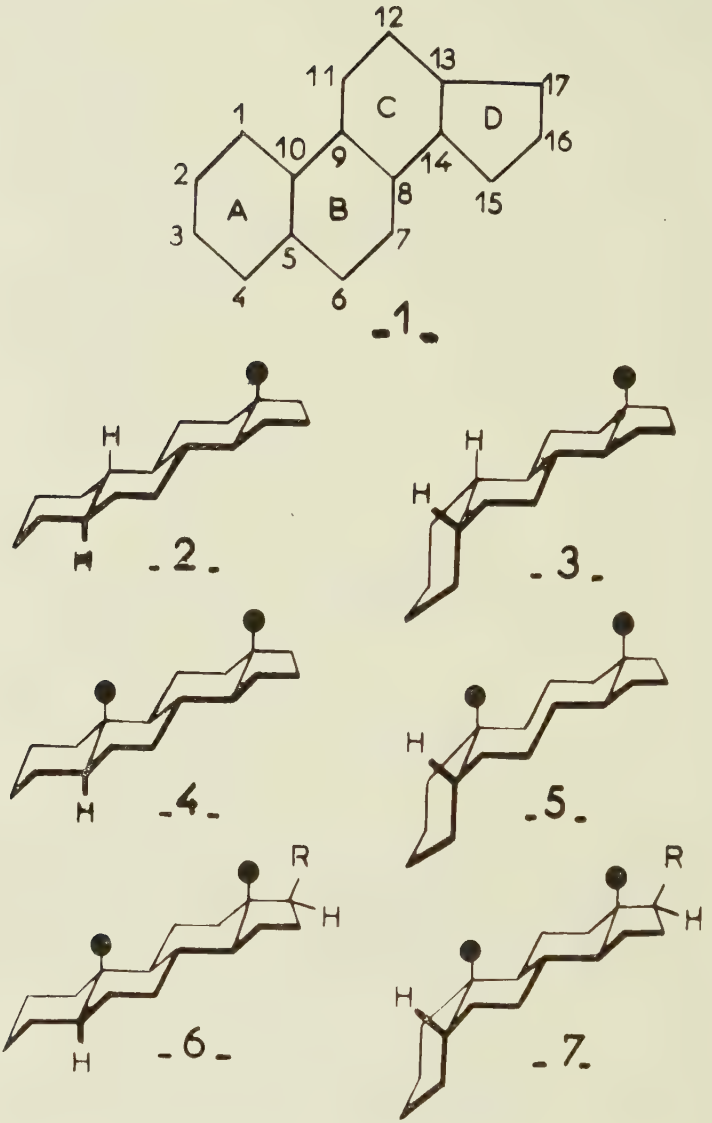


FIGURE N° 1

Configurations spatiales des squelettes hydrocarbonés de base des principales familles de stéroïdes : (1 : gonane ; 2 : 5 α estrane ; 3 : 3 : 5 β estrane ; 4 : α androstane ; 5 : β androstane ; 6 : 5 α prégnane : 6 : 7 : 5 β prégnane ; .— : CH_3 ; R : C_2H_5).

TERMINOLOGIE OU NOMENCLATURE

Nous avons déjà cité le nom du squelette hydrocarboné de base des androgènes, l'androstane. Le suffixe ane indique que la molécule est saturée. De ce fait, un atome d'hydrogène se trouve

lié au carbone —5. Aussi fait-on précéder le nom du squelette du préfixe 5 α ou 5 β selon que le carbure appartient à la série allo ou étio.

Si une liaison éthylénique est présente dans la molécule, la terminologie est ène ; ce suffixe est précédé du numéro correspondant à l'atome de carbone portant la double liaison et chiffré le plus bas dans la numérotation officielle. Ceci à la condition que les deux atomes de carbone de la double liaison aient deux numéros qui se suivent.

Le suffixe ol indique la présence d'une fonction hydroxylée (alcool ou phénol). Il est précédé du numéro de l'atome de carbone portant l'hydroxyle —OH et de la lettre grecque α ou β selon que le groupement fonctionnel est en position cis ou trans par rapport au méthyl angulaires (voir Figure n° 2).

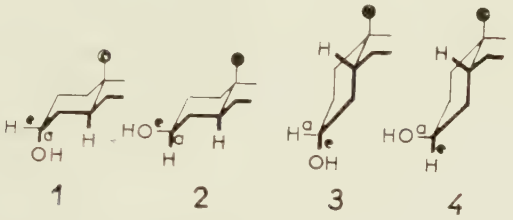


FIGURE N° 2

Stéréoisomérie d'un groupement hydroxyle sur un atome de carbone —3 (1 : 5-α-ane-3-α-ol ; 2 : 5 α-ane--3-β-ol ; 3 : 5-β-ane-3-α-ol ; 4 : 5-β-ane-3-β-ol).

Le suffixe one, suivant le numéro d'un atome de carbone, désigne une fonction cétone située sur le carbone en question. Les auteurs anglo-saxons utilisent également le suffixe oxo.

Un stéroïde étant pris comme référence, diverses modifications structurales conduisent à différents dérivés. Ceux-ci sont désignés par le nom du stéroïdes de référence précédé d'un préfixe :

— l'inversion de la position de la liaison d'un substituant conduit au dérivé épi.

— l'élimination de deux atomes d'hydrogène, placés sur des atomes de carbone voisins, avec formation d'une double liaison, conduite à un dérivé déhydro.

Ces notions de terminologie sont utilisées dans la nomenclature des différents 17-étostéroïdes que l'on rencontre dans les urines, à savoir :

— l'androstérone ou 5 α-androstane 3 α-ol 17-one.

— l'étiocholanolone ou 5 β-androstane 3 α-ol 17-one.

— la déhydroépiandrostérone ou androsta-5-ène 3 β-ol 17-one

— la 11-hydroxyandrostérone ou 5 α-androstane 3 α, 11 β-diol 17-one.

— la 11-hydroxyétiocholanolone ou 5 β-androstane 3 α, 11 β-diol 17-one.

— la 11-cétoandrostérone ou 5 α-androstane 3 α-ol, 11, 17-dione

— la 11-cétoétiocholanolone ou 5 β-androstane 3 α-ol, 11, 17-dione.

Nous avons rassemblé dans la figure n° 3 un schéma représentant l'origine de ces hormones et les 17-cétostéroïdes présents dans l'urine.

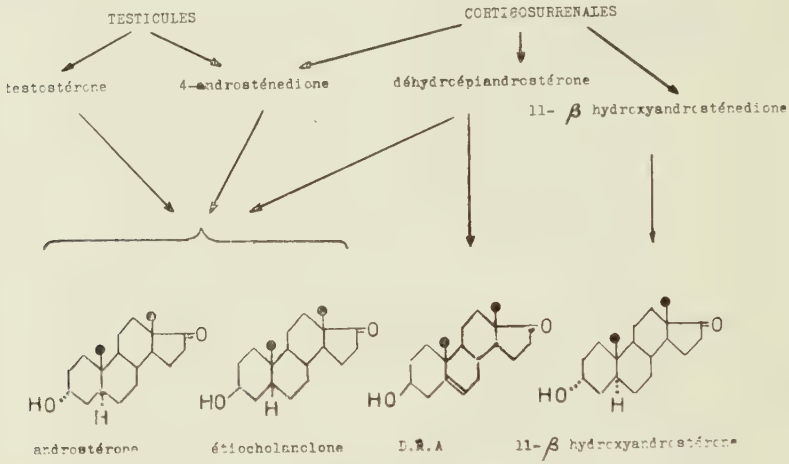


FIGURE N° 3

Origine métabolique des 17-cétostéroïdes.

B) Structures particulières et réactions colorées

a) GENERALITES SUR LES REACITONS COLOREES UTILISEES DANS LA CHIMIE ANALYTIQUE DES HORMONES STEROIDES

Les stéroïdes hormonaux se caractérisent par leur squelette hydrocarboné et par la présence de groupements fonctionnels éthyléniques et oxygénés dont le nombre, la nature, la position et l'orientation déterminent pour chaque stéroïde ses propriétés physicochimiques et ses réactions analytiques. Les techniques mises en œuvre pour effectuer les microdosages par voie colorimétrique ressortent des méthodes générales de la chimie analytique classique. On peut les ranger en deux groupes selon que le réactif intervient directement dans la formation du pigment ou selon qu'il ne

participe pas directement à cette formation (halochromie, halofluorie).

Dans le premier groupe de réactions on envisage trois modalités d'application différentes, soit condenser la substance à doser avec une molécule portant un groupement chromophore, soit dégrader le stéroïde et copuler un des fragments obtenus avec un réactif spécifique ; enfin les effets réducteurs qu'exercent certains composés stéroïdiques sur la forme incolore de dérivés organiques sont mis à profit pour déterminer des réactions colorées. Ces techniques s'adressent aux dosages des hydroxystéroïdes, des cétostéroïdes et des dérivés du prégnane.

1) *Réactions de condensation.* — En ce qui concerne le dosage colorimétrique des hydroxytéroïdes, il est nécessaire de procéder au préalable à une estérification. Après acétylation, l'ester formé subit l'aminolyse en présence d'hydroxylamine et conduit à la formation d'acide hydroxamique. Ce dernier donne, en présence de perchlorure de fer, un complexe pourpre (13, 63). Les esters de l'acide 2,4-dinitrobenzoïque comprenant une structure métadinitrée, se condensent avec de l'acétone en milieu alcalin pour donner un dérivé bleu (voir réaction de ZIMMERMANN, (34).

Les réactions colorées fournies par les cétostéroïdes sont de loin les plus nombreuses. Le carbonyle se trouve le plus généralement fixé sur les carbones 3, 17 ou 21 et est présent sur la molécule soit seul, soit accompagné d'autres groupements fonctionnels qui en modifient la réactivité (hydroxyles ou liaisons éthyléniques).

La copulation de la fonction cétone avec des réactifs azotés et en particulier avec les hydrazines est largement exploitée. C'est ainsi que la 2,4 dinitrophénylhydrazine fournit en milieu acide une hydrazone jaune, coloration due au groupement dinitré. On effectue alors le dosage colorimétrique de l'hydrazone après élimination de l'excès de réactif où l'on profite du fait que ces hydrazones donnent en milieu alcalin une intense coloration rouge (20). PESEZ et BARTOS (47) proposent d'effectuer la condensation en milieu non aqueux (éthanol chlorhydrique) de la cétone avec la p-nitrophénylhydrazine. L'addition de benzyltriméthylammonium en solution dans la formamide développe des colorations rouges et violettes sélectives. La phénylhydrazine est utilisée dans la réaction de PORTER et SILBER en raison d'une particularité de sa réactivité avec le groupement α-cétol.

La p-diméthylaminoaniline donne en milieu méthanol-perchlorique une imine intensément colorée avec les céto-3-stéroïdes insaturés en —4 (4). L'hydrazine de l'acide iso-nicotinique donne un pigment jaune citron avec les céto-3-stéroïdes insaturés en —4 et 1— (59, 62, 38).

On sait que le carbonyle induit une mobilité particulière des hydrogènes méthyléniques fixés en α. Cette réactivité est mise à profit pour obtenir une coloration avec le nitroprussiate. L'intensité de la coloration obtenue avec les stéroïdes n'est pas assez im-

portante pour recevoir une application analytique. Par contre la réaction de JANOVSKI (28, 29) qui consiste à obtenir un chromogène bleu par action du m-dinitrobenzène en milieu alcalin sur le méthylène activé a été développée par ZIMMERMANN (64) et a reçu de très nombreuses applications. Les 3-cétones et les 17-cétones conduisent à un composé coloré rouge-violet ; les 20 ones ne donnent qu'une coloration faible et les 11-ones ne fournissent aucune coloration. Dans le cas des 3-cétostéroïdes, l'insaturation du polycycle en 4-5 diminue l'intensité de la coloration, une deuxième fonction cétone en 11 l'exalte, par contre l'existence de deux liaisons éthyléniques en 1-2 et 4-5 l'inhibe totalement.

L'ionol ou 2,6 di-ter-butyl p-crésol, à chaud, en milieu alcalin et en présence d'eau oxygénée, réagit avec les 3 cétones.

Les colorations développées permettent de différencier les 3-cétostéroïdes saturés (rose), les 3-cétostéroïdes insaturés en 4-5 (bleu) avec ceux possédant en outre un carbonyle en 11 (jaune-orangé) (4).

2. — *Réactions d'oxydation.* — L'oxydation des chaînes latérales éthyles des dérivés du prégnane offre des possibilités intéressantes. Selon la nature, le nombre et la position des fonctions oxygénées présentes, des réactions différentielles peuvent être réalisées.

Le caractère réducteur des α-glycols est mis à profit avec l'emploi de réactifs minéraux (nitrate d'argent ammoniacal, acide phosphotungstomolybdique, liqueur cupro-alcaline) ou organiques (oxydation des leuco-dérivés en composés colorés correspondants).

L'oxydation des chaînes glycol par les acides chromiques, bismuthique et périodique libère des aldéhydes (formol ou éthanal) que l'on pourra copuler avec leurs réactifs classiques. La présence d'un hydroxyle en 17 conduit après élimination de la chaîne à des 17-cétostéroïdes qui peuvent être dosés comme tels.

3. — *Halochromie et Halofluorie.* — Ces réactions sont complexes et résultent beaucoup plus d'observations empiriques que d'applications de données théoriques. On les classe en fonction du réactif mis en œuvre : acide sulfurique seul ou additionné de composés divers (minéraux ou organiques) — acides phosphorique, perchlorique, formique — halogénures à caractère acide selon LEWIS : trichlorure d'antimoine et trichlorure de zinc par exemple.

L'acide sulfurique concentré conduit, après action de la chaleur, à des colorations jaune à rouge et des fluorescences jaune à orangé. Les stéroïdes étant peu solubles dans l'acide pur, on peut opérer en diluant celui-ci par de l'éthanol, ou en dissolvant le stéroïdes dans du chloroforme et addition d'acide sulfurique au milieu (réaction de SALKOWSKI) ou bien addition d'un mélange d'acide sulfurique-anhydride acétique (réaction de LIBERMAN).

L'acide sulfurique peut être accompagné d'aldéhydes (acide glyoxylique-furfural réaction de PETTENKOFER) ou de divers composés organiques (phénylhydrazine, phénols : phénol hydroquinone, α-naphtol, gaïacol) ou minéraux (brome, sels de cuivre ou de fer).

L'acide phosphorique est très utilisé pour la détection des spots en chromatographie sur papier. Il donne après action de la chaleur une coloration vert-bleu avec de nombreux corticostéroïdes. Les acides chlorhydrique, perchlorique, formique ont été également mis en œuvre.

Le trichlorure d'antimoine en solution saturée dans le chloroforme initialement proposé par CARR et PRICE pour l'analyse des caroténoïdes a vu son emploi étendu à d'autres dérivés et en particulier aux stéroïdes. Il développe avec l'androstérone une coloration bleue. D'autres composés analogues : trichlorure d'arsenic, tétrachlorure de titane, pentachlorure d'antimoine ont été également retenus.

Enfin signalons l'emploi de l'acétate de mercure en milieu nitrique concentré proposé par ROSENHEIM et CALLOW et le réactif sulfo-acéto-mercurique mis à profit par PESEZ pour doser sélectivement la fonction 3-ol (46).

b) REACTIONS COLOREES DES 17-CETOSTEROIDES

Au point de vue clinique dans la pratique courante, on distingue plusieurs types de dosage : le premier comprend le dosage de routine des 17-cétostéroïdes totaux ; les autres plus sépcifiques permettent de doser la DHA, les 11-oxy-17-cétostéroïdes et l'androstérone.

DOSAGE DES 17-CETOSTEROIDES TOTAUX

Ces cétostéroïdes possèdent une réaction colorée de groupe. Le principe de celle-ci résulte de l'observation faite en 1886 par JANOVSKY (27, 28). Cet auteur a montré que l'acétone se condense, en milieu alcalin, avec le métadinitrobenzène pour donner une coloration bleue. De très nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de cette réaction. Il a été montré qu'elle est en rapport avec la présence dans la molécule cétonique d'un méthylène activé situé en α du groupement fonctionnel carbonyl. La présence contiguë du carbonyl et du groupement méthylénique, point d'impact de la réaction, a été reconnu par REISSERT (51) ; le mécanisme consiste en l'addition de l'ion carbénium de la cétone et de la forme quinoïde du méta-dinitrobenzène en présence d'alcali. L'excès de réactif déshydrate la liaison carbone primitivement formée, conduisant à une liaison éthylénique et à un système résonnant. La figure n° 4 présente le schéma de la réaction tel qu'il est le plus généralement admis.

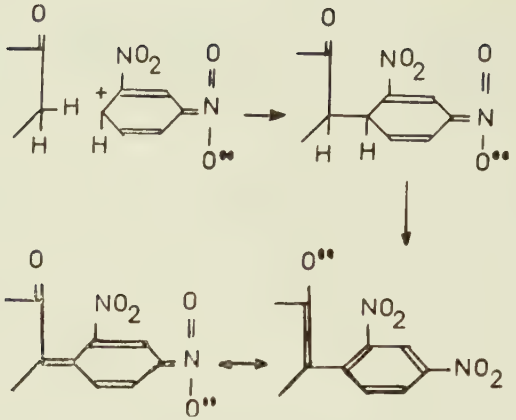


FIGURE N° 4

Schéma de la réaction de ZIMMERMANN

De très nombreuses modifications ont été apportées à la réaction originale. Elles ont eu pour but d'obtenir une réaction d'égale intensité pour une même quantité de n'importe lequel des 17-cétostéroïdes urinaires, de diminuer l'intensité de la coloration du témoin constitué du mélange des réactifs et d'augmenter la spécificité de telle sorte que les composés autres que les 17 cétones n'interfèrent pas ou peu sur le développement de la coloration.

Les efforts ont porté sur divers points de la technique. Tout d'abord sur le choix du dérivé méta-dinitré. A côté du métadinitrobenzène qui demeure le plus employé, l'acide 3,5-dinitrobenzoïque et le 1,3-dinitrophtalène ont été proposés (57, 5). La potasse est le plus souvent mise en œuvre soit en milieu aqueu, soit en milieu alcoolique (méthanol, éthanol), cependant certains auteurs lui préfèrent la pyridine (48) ou le benzyl-triméthyl ammonium (6, 12).

Température et durée de la condensation ont été également étudiées : température basse (25°C) et durée de condensation élevée (2 heures) ; température relativement élevée (37°C) et durée de condensation réduite à 30 minutes.

Malgré ces efforts certaines substances interfèrent ; aussi dans la plupart des techniques il est préconisé d'apporter une correction aux mesures photométriques (type correction d'Allen) (1) ou bien d'extraire les chromogènes par un solvant tel que le chloroforme (8), l'éther sulfurique (13) ou le dichlorométhane (49).

LA DEHYDROEPIANDROSTERONE (DHA)

La DHA est éliminée sous forme d'ester sulfate, liaison fragile, elle est libérée de sa combinaison à pH 4,7 par chauffage à 100° à reflux pendant 4 heures. En se basant sur ce processus d'hydroly-

se, qui paraît plus spécifique, puis en extrayant ce stéroïde libéré, on apprécie la valeur de l'excrétion en effectuant sur l'extrait la réaction de ZIMMERMANN (31).

D'autres techniques plus spécifiques ont été préconisées par KOBER, ALLEN et PETTENKOFFER.

La réaction de KOBER (16) consiste à faire incuber pendant 20 minutes à 25°C la DHA dans de l'acide sulfurique concentré. Après addition d'un volume d'eau convenable et en portant la liqueur au bain-marie pendant une minute on obtient une coloration bleue caractéristique.

La réaction d'ALLEN (2) consiste à traiter la DHA par un réactif alcoolo-sulfurique et à chauffer le mélange pendant 12 minutes à 55°C. Après cette opération, le milieu refroidi est additionné d'éthanol à 95°. Une coloration pourpre intense se développe.

La réaction de PETTENKOFFER (45) résulte de l'extension du dosage de la DHA du réactif proposé par cet auteur (acide sulfurique, acide acétique, furfural) pour le dosage des acides biliaires. Cette réaction conduit à une coloration bleue.

DOSAGE DE L'ANDROSTERONE

Une réaction colorée de ce stéroïde a été proposée par PONTIUS (50). L'androstérone est traitée pendant 90 seconde à 100°C par un réactif composé d'une solution d'acide monochloracétique et d'acide perchlorique dans l'éther éthylique. Après une nouvelle addition d'acide perchlorique et un nouveau chauffage, il se développe une coloration qui présente un maximum d'absorption à $\lambda m = 546$ mμ.

II. — HYDROLYSE DES FORMES CONJUGUEES D'ELIMINATION URINAIRE DES 17-CETOSTEROIDES

Les hormones stéroïdes sont présentes dans l'urine en majeure partie sous forme de dérivés solubles dans l'eau : glycuronides et sulfates. Ceux-ci résultant de l'élimination d'une molécule d'eau entre un groupement hydroxylé d'un stéroïde et, dans le premier cas, un hydroxyle alcoolique de l'acide glycuronique pour donner une liaison osidique, dans le second cas, une fonction acide de l'acide sulfurique pour conduire à une liaison ester.

Il est donc nécessaire de rompre ces liaisons afin de libérer les hormones, de les rendre solubles en phase organique et de les extraire des milieux biologiques.

Si le groupement fonctionnel ester est fragile, il n'en est pas de même de la liaison osidique. Cependant l'hydrolyse totale des liaisons par voie chimique conduit à se placer dans les conditions de rupture de la liaison la plus stable. Au point de vue pratique, on assure la rupture de tous les types de liaison par l'action de la

chaleur, en présence d'un acide minéral fort. Or les stéroïdes sont pour la plupart des molécules fragiles qui dans ces conditions subissent des déshydratations, des épimérisations et des halogénations. Aussi s'est-on orienté vers la mise en œuvre de procédés plus doux par l'emploi de catalyseurs biologiques : β-glycuronidases et sulfatases.

A) Hydrolyse chimique

a) ACTION DES ACIDES MINERAUX FORTS

L'hydrolyse des liaisons osidiques et esters sulfates est obtenue en milieu chlorhydrique ou sulfurique. A molarité égale, ces deux acides ont une activité analogue.

On opère en général en présence d'acide chlorhydrique en additionnant l'urine du dixième de son volume d'acide concentré (d = 1,19). L'opération est réalisée en 30 minutes environ à l'ébullition. L'hydrolyse spécifique des liaisons ester-sulfates s'obtient à 100° en 4 heures à pH 5,0.

Le principal avantage de ces techniques réside dans leur rapidité. Cependant, si l'on n'observe aucune modification des corticoïdes à chaîne α-cétol de l'androstérone, du prégnandiol, de l'oestriol et de l'oestrone, par contre certains stéroïdes sont transformés ou même détruits. Dans le cas des urines pathologiques (diabète), les composés non stéroïdiques conduisent à une destruction des phénolstéroïdes. En outre, on note que certains constituants urinaires fournissent des pigments difficiles à éliminer des extraits qui faussent les déterminations colorimétriques.

Lorsque l'on introduit l'acide après avoir porté les urines à l'ébullition, c'est-à-dire après avoir chassé l'oxygène dissous, la destruction des stéroïdes est moins importante. Cette observation conduit à ajouter aux urines des agents réducteurs. DINGEMANSE et coll. proposent de diminuer la quantité d'acide mise en jeu. Ils opèrent en présence de benzène ou de toluène. Au fur et à mesure de la libération des stéroïdes, ceux-ci se solubilisent dans la phase organique et échappent à l'action néfaste des acides minéraux.

b) SOLVOLYSE

Cette opération est spécifique de l'hydrolyse des esters sulfates. Elle est conduite en milieu acide en présence de solvants organiques oxygénés (dioxane, tétrahydrofuran, éther-oxyde). Dans ces conditions l'oxygène du solvant passe à l'état d'ion oxonium. Celui-ci déplace le radical sulfuryl de la fonction ester et lui substitue un hydrogène.

L'activité solvolytique du réactif diminue avec sa polarité ; elle est inversement proportionnelle à son pouvoir d'ionisation. La vitesse de la réaction dépend de la structure de la copule stéroïdi-

que. Très rapide avec les 21-esters de la cortisone, elle est plus lente dans le cas du sulfate d'épiandrostérone. Le sulfate d'androstérone est le plus lentement hydrolysé.

Ce type d'opération respecte la structure du stéroïde, sauf dans quelques cas particuliers (10, 7).

B) Hydrolyse enzymatique

LES β-GLYCURONIDASES

Les β-glycuronidases hydrolysent les glycuronides en acide glycuronique et en aglycone. Ces enzymes se trouvent répandus dans divers tissus des animaux supérieurs : foie, rate et organes génitaux. Les bactéries (Escherichia coli), les gastéropodes (Helix pomatia) et les mollusques (Listorina littorea et Patella vulgata) possèdent une puissante activité glycuronidasique.

L'hydrolyse enzymatique respecte la structure des stéroïdes. Les inconvénients de cette méthode sont ceux que l'on rencontre classiquement dans la mise en œuvre d'un matréiel biologique : réactions d'équilibre, présence d'inhibiteurs et d'agents de compétition.

L'existence d'inhibiteurs dans les urines a conduit certains auteurs à préconiser l'extraction préalable des formes conjuguées. L'hydrolyse se conduit alors sur une préparation purifiée. JAYLE propose d'incuber l'urine en présence de 500 unités de β-glycuronidase d'Helix pomatia par millilitre d'urine à 37°C et pH 5,2 pendant 24 heures. Au bout de ce temps, on ajoute au milieu une quantité égale d'enzyme et on poursuit l'opération pendant encore une journée. Il apparaît donc que la principale difficulté réside dans une certaine incertitude relative à l'hydrolyse totale des liaisons.

LES SULFATASES

Les hépatopancréas de Patella vulgata, le suc digestif d'Helix pomatia et une préparation d'Aspergillus orizae constituent les sources les plus importantes de sulfatases.

HENRY et THEVENET (23) préconisent la dilution préalable des urines au demi ou au dixième selon leur teneur en ions phosphoriques. En présence de 500 unités de sulfatases par millilitre d'urine et en opérant à pH 5,0 et à 37°C la quasi-totalité des sulfates neutres est hydrolysée en 18 heures. Le sulfate d'androstérone et d'une façon générale les sulfates de stéroïdes de structure 5 α — 3 α ne s'attaquent que très difficilement.

III. — METHODES DE SEPARATION DES STEROIDES URINAIRES

A) Séparations Chimiques

Ce type de séparation ne permet pas, vu la complexité de l'extrait urinaire, d'isoler les stéroïdes les uns des autres mais seulement d'effectuer des séparations de groupes. Trois procédés sont couramment utilisés.

Lorsqu'on dispose d'un mélange de stéroïdes, on peut isoler la totalité des dérivés hydroxylés en traitant l'extrait par l'anhydride succinique ou l'ahydride phtalique. Il se forme un ester-monoacide soluble en phase aqueuse en raison de la présence du carboxyle hydrophile. Ceci constitue un procédé commode de séparation car les dérivés non hydroxylés ne peuvent s'estérifier et demeurent solubles en phase organique.

L'isolement des 3-β hydroxystéroïdes est réalisé par l'emploi de la digitonine. au mélange des deux séries épimères 3 α-ol et 3 β-ol on obtient un complexe insoluble constitué de la saponine et des 3 β-hydroxydérivés. Traité à chaud par de la pyridine, le précipité régénère ses constituants et permet la récupération des stéroïdes.

En ce qui concerne les cétostéroïdes, GIRARD (18) propose leur isolement à l'aide d'un réactif dit réactif T de Girard. Celui-ci est l'hydrazide de la bétaine du glycocolle

$$(CH_3)_3 \equiv \overset{+}{N} - CH_2 - CO - NH - NH_2$$

L'élimination d'un molécule d'eau entre le carbonyle et l'hydrazine conduit à une hydrazone. Cette dernière est soluble dans l'eau grâce à la présence du groupement trimétylammonium.

B) Séparations chromatogaphiques des Stéroïdes

Les hormones stéroïdes son isolées des milieux biologiques soit à des fins analytiques, soit à des fins préparatives. Dans les extraits de produits naturels, un grand nombre de composés voisins existe et les problèmes délicats de purifications ne peuvent être résolus qu'à l'aide de plusieurs techniques reposant sur des principes différents. L'utilisation de solvants sélectifs permet des séparations de groupes mais aussi la concentration de stéroïdes qui ne sont présents dans la nature qu'à l'état dilué. Seules les méthodes chromatographiques se sont révélées aptes à résoudre les nombreux cas particuliers.

La chromatographie de partage et la chromatographie d'adsorption ont été retenues, la chromatographie par échange d'ions n'a été qu'assez peu utilisée.

Au point de vue technique, la chromatographie est mise en œuvre soit en colonne : chromatographie liquide-liquide, chromatographie solide-liquide, chromatographie liquide-gaz, soit sur des supports tels que le papier ou des plaques de verre recouvertes d'une phase solide (chromatographie en couches minces).

a) CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

1) *Chromatographie liquide-liquide.* — C'est la chromatographie de partage telle qu'elle a été proposée par MARTIN et SYNGE (44). Elle s'appuie sur les mêmes principes que la séparation à contre-courant de CRAIG et utilise systématiquement l'élution fractionnée. Les colonnes sont remplies d'une phase inerte supportant une phase fixe de nature polaire. La phase mobile de nature apolaire, de composition constante, opère la séparation et l'élution des différents composés soumis à la chromatographie.

Une modalité différente a été proposée par HOWARD et MARTIN (26). Elle consiste à placer sur le support interte la phase apolaire qui devient ainsi la phase fixe, le solvant polaire devenant la phase mobile. Cette technique est dite en phases inversées.

Les phases inertes les plus usinées sont les terres d'infusoires, le gel de silice et la cellulose. Parmi les phases fixes polaires citons l'eau, le méthanol, divers glycols (éthylène glycol, propylène-glycol, cellosolve), le formamide, le nitrométhane. En phases inversées, la poudre de caoutchouc et les silicones ont reçu de nombreuses applications. De très nombreux solvants dont nous ne pouvons donner ici une liste complète ont été mis en œuvre.

La position d'une substance dans la colonne, en d'autres termes son ordre d'élution dépend essentiellement de son coefficient de partage dans le système binaire considéré (phase fixe/phase mobile) à la condition qu'aucun phénomène secondaire (absorption, chélation) n'intervienne d'une manière sensible. Dans une chromatographie normale, une substance se déplace d'autant plus facilement que sa polarité est plus faible. C'est évidemment le contraire dans les techniques en phases inversées.

La chromatographie des 17-cétostéroïdes n'a été que peu exploitée. Elle permet cependant d'effectuer la détermination des sept principaux 17-cétone.

2) *Chromatographie solide-liquide.* — Utilisée pour la première fois par CALLOW et coll. en 1939, cette technique repose sur l'adsorption du matériel à séparer par une phase fixe solide, puis à réaliser l'élution fractionnée à l'aide de solvants dont la polarité croît. Elle permet d'effectuer des séparations dans une gamme étendue de quantité de matière première allant de quelques milligrammes à des centaines de grammes. De ce fait, cette technique a pris une place importante dans le domaine de la microanalyse et sur le plan industriel.

Les phases adsorbantes les plus couramment utilisées sont l'alumine, le silicate de magnésium, le gel de silice, le carbonate de magnésium, le silicate d'aluminium. Ces substances sont mises en œuvre soit seules, soit diluées par une matière inerte (terre d'infusoire par exemple). Les stéroïdes dissous dans un solvant approprié : benzène, tétrachlorure de carbone, sont adsorbés sur la phase. On opère alors par élution fractionnée dont le principe a été proposé par les écoles de REICHTEN et RUZICKA. Cette opération consiste à faire passer sur la colonne des volumes fixes de solvants ayant des pouvoirs éluants croissants, de manière non seulement à séparer le long de la colonne les substances adsorbées, mais aussi à les éluer les unes après les autres. L'éluat est divisé en fractions, plus ou moins arbitrairement, en se basant sur des essais préliminaires d'orientation.

Les principaux problèmes posés par ce type de chromatographie sont relatifs à l'activité de l'adsorbant. Celle-ci dépend de la taille des particules, de l'état d'hydratation, de l'acidité ou de l'alcalinité propre. La qualité de la séparation analytique est en relation avec les dimensions de la colonne (longueur et diamètre) avec la quantité d'adsorbant mis en œuvre ainsi qu'avec les volumes, la composition et la vitesse de passage des différents solvants.

A l'heure actuelle, la technique évolue dans le sens de l'utilisation, non pas de différents solvants de composition fixe, mais d'un solvant dont la composition varie graduellement en fonction du déroulement de l'analyse (chromatographie par gradient de concentration). L'avantage essentiel de ce procédé réside dans un automatisme plus poussé.

La chromatographie d'adsorption a permis la séparation de la plupart des stéroïdes. La séparation des 17-cétostéroïdes en six ou sept groupes de fractions a pris le développement le plus important dans l'analyse biologique courante (DINGEMANSE et coll.) (15). La chromatographie des 2,4-dinitrophényl, hydrazones des stéroïdes présente également des possibilités intéressantes.

3) *Chromatographie liquide-gaz.* — La chromatographie dite en phase gazeuse a pris ces dernières années une place de choix dans l'analyse des composés organiques en raison de sa rapidité, de sa sensibilité et de son pouvoir de résolution élevé. Malheureusement, le matériel n'était pas jusqu'à ces derniers temps parfaitement adapté pour fonctionner aux températures élevées nécessitées par les faibles tensions de vapeur des stéroïdes.

Les efforts ont porté sur divers points qui sont : la préparation de phases liquides stables aux températures de travail, la construction de détecteurs conservant dans ces conditions leur sensibilité, la synthèse à l'échelle micro-analytique de dérivés de stéroïdes (éthers ou esters) stables et plus volatis que les stéroïdes eux-mêmes.

Quatre types de phases stationnaires sont reconnues aptes à la séparation des stéroïdes :

— les méthyl-silicones (SE-20, SE-30, SE-52, SF-96).

— les fluoroalqylsilicones (QF-1) particulièrement satisfaisants pour la séparation des hydroxystéroïdes ;

— les phénylsilicones qui permettent une bonne spéparation des dérivés insaturés ;

— enfin le néo-pentylglycol succinate (ester succinique du 2,2'-diméthylpropane 1,3 diol), l'éthylène glycol isophtalate et le cyanométhylsilicone dont les possibilités sont les plus nombreuses puisqu'ils permettent de séparer à la fois les épimères hydroxylés et les stéroïdes insaturés.

D'importantes recherches ont été effectuées sur l'influence de la structure des hormones et leur ordre de sortie sur des phases liquides de polarités différentes (9, 22, 36, 37, 42, 56, 60, 61).

L'application de la chromatoraphie en phase azeuse à l'analyse des stéroïdes hormonaux urinaires est orientée vers la séparation des 17-cétostéroïdes.

COOPER et CREECH (11), ainsi que HAAHTI, VANDENHEUVEL et HORNING (21) ont été les premiers à effectuer la séparation et le dosage de l'androstérone, de la 5-β androstérone et de la D.H.A. En 1952, SPARAGNA, MASON et KEUTMANN (53) isolent la fraction cétostéroïdique des urines par le réactif de Girard. La chromatographie en phase gazeuse est réalisée sur une colonne de 12 pieds, garnie de SE-30 porté par du Gaz-chrom P silanisé, le gaz vecteur est l'argon utilisé à un débit de 27 ml/mn et à une température de 221°C. Elle permet de séparer six pics correspondants aux principaux 17-cétostéroïdes urinaires.

Plus récemment la séparation et le dosage des 17-cétostéroïdes urinaires, sous forme d'esters triméthylsilyl sur des colonnes à phase stationnaire sélective, ont été nettement améliorés. Ces dérivés sont formés par réaction avec l'hexaméthyl-disilazane dans le chloroforme en présence de triméthylchlorosilane comme catalyseur. Les colonnes employées ont un diamètre extérieur de 6 mm, leur longueur varie entre 1,50 m et 3 m. On opère à une température de 200°C à 225°C. Les phases stationnaires sélectives les plus utilisées sont QF 1, XE 60, et les polyesters. Ces phases stationnaires sont employées à des concentrations de 1 à 3 % sur des supports bien inactivés (24).

b) CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

La chromatographie sur papier telle qu'elle a été introduite par CONDSEN, GORDON et MARTIN trouve son application principale dans la séparation des substances hydrophiles (aminoacides, oses). Dans le cas des composés hydrophobes tels que les stéroïdes elle n'a été mise directement en œuvre tout d'abord que pour les substance ionisables. Ce n'est que grâce aux travaux de ZAFFARONI et coll., de BUSCH et coll. et par l'emploi de

la chromatographie en phases inversées que cette technique a pris un essor considérable et qu'elle a été étendue à l'analyse de tous les stéroïdes.

La chromatographie de partage sur papier permet d'opérer avec une grande économie de matière première, de temps et de travail. Cependant les résultats doivent être interprétés avec beaucoup de sens critique.

Les systèmes de solvants décrits à l'heure actuelle sont classés en quatre groupes :

— les systèmes aqueux au sens classique sans technique spéciale d'imprégnation et d'équilibration utilisés pour la séparation des composés polaires ou ionisables (phénolstéroïdes).

— les systèmes type "Zaffaroni" : on dépose les substances à séparer sur une feuille de papier imprégnée de phase polaire anhydre le plus souvent (glycols) ; la phase mobile apolaire est ensuite admise à parcourir le document.

— les systèmes types "Busch" : la feuille de papier, chargée des substances, est placée dans une enceinte saturée des vapeurs de la phase mobile et de la phase fixe. Le papier s'imprègne du solvant polaire (eau, alcool), la phase apolaire permet de développer le chromatogramme.

— les systèmes à phases inversées : le papier est imprégné de substances apolaires (vaseline, huile de paraffine, silicone). Il est alors apte à retenir une phase stationnaire peu polaire (alcool,

TABLEAU I

Principales réactions de révélation des stéroïdes en chromatographie sur papier

STRUCTURES	REACTIFS
α-cétol	B. de Tollens
α-cétol	Chlor de Triphényltétrazolium
α-cétol	Bleu de tétrazolium
Cétones α-β insaturés	Iode dans l'éther de pétrole
Cétones α-β insaturés	Lumière ultraviolette
Cétones α-β insaturés	Vapeur d'acide osmique
Δ-4-cétones	NaOH (fluorescence)
Cortisone et apparentés	Iode en sol. aqueuse
3-ol	Acide phosphomolybdique
3-ol	Acide silicotungstique
3-ol et prégnandiols	Trichlorure d'antimoine
Divers types	PO_4H_3 (fluorescence)
Cétostéroïdes	2,4-dinitrophénylhydazine
17-cétostéroïdes	m-dinitrobenzène KOH
Oestrogènes	Ac. sulfanilique diazoté

chloroforme, cyclohexane, tétrachlorure de carbone). La phase mobile est beaucoup plus polaire (eau, alcool, formamide, acide acétique, ammoniaque).

Les techniques de révélation sont nombreuses et variées. Elles sont choisies en fonction des propriétés chimiques et de la structure des composés que l'on désire détecter. Nous avons rassemblé dans le tableau n° 1 les principales méthodes de détections ainsi que les groupements fonctionnels ou les structures qui s'y rapportent.

Il n'est pas possible ici de présenter l'ensemble des applications de cette méthode, de nombreux ouvrages traitant de cette question rassemblent les résultats déjà enregistrés (29, 40).

c) LA CHROMATOGRAPHIE EN COUCHES MINCES

Ce nouveau type de chromatographie consiste à réaliser une séparation à l'aide d'un solvant convenable, sur un support minéral étalé en couche mince sur une plaque de verre (14, 55).

TECHNIQUE

On dépose grâce à un appareillage spécial, une suspension aqueuse de la phase fixe (gel de silice, alumine) additionnée ou non d'un agent liant tel que le plâtre. Après la " prise" de la couche à la température ordinaire, on attend sa dessication complète ou bien on porte la plaque dans une étuve. Dans ce dernier cas la durée et la température de chauffage conduisent à des préparations plus ou moins actives. Les plaques préparées à l'avance sont conservées dans un exsicateur contenant lui-même de la phase activée.

On applique les échantillons sur la plaque à 2 cm du bord inférieur de celle-ci à l'aide d'une micropipette ou d'un dispositif équivalent. Le volume de liqueur déposé est de l'ordre de 1 à 10 µl.

On introduit la plaque dans une cuve de dimension convenable. Au fond de celle-ci on a disposé une quantité de solvant telle que la partie inférieure de la plaque soit immergée de 1 centimètre. On obture la cuve à l'aide d'une plaque de verre. Le solvant imprègne la plaque de bas en haut en développant une chromatographie ascendante jusqu'à ce que le front ait atteint une distance de 10 cm. On retire alors la plaque et on évapore le solvant sous l'influence d'un léger courant d'air. On procède à la révélation des spots.

Les avantages de ce type de chromatographie sont nombreux :

— économie de temps : la durée de la séparation est de 30 à 60 minutes au maximum

– économie de matériel : les spots extrêmement petits amènent une concentration de la substance au centimètre carré infiniment plus grande qu'en chromatographie sur papier, par exemple.

— le nombre de techniques utilisables pour révéler les composés est pratiquement illimité. Tous les procédés de la chromatographie sur papier lui sont applicables et de plus, en raison de la résistance du support aux agents chimiques et physiques, de nombreuses méthodes originales peuvent être employées. Les réactifs agressifs (acide sulfurique concentré) et des températures élevées (200°C et plus) sont permis.

— tous les solvants de développement sont utilisables, sauf les solvants très aqueux. Le choix de la phase mobile est relativement facile à déterminer. On peut pour cela se baser sur la classification des solvants placés par pouvoir éluotrope croissant, soit : hexane, tétrachlorure de carbone, benzène, chlorure de méthyle, chloroforme, oxyde d'éthyle, acétate d'éthyle, acétone propanol, éthanol, méthanol, pyridine.

Le mélange de deux, trois, voire même quatre solvants est possible et permet d'obtenir une polarité parfaitement adaptée à la séparation envisagée. La vitesse de l'opération conduit à la mise au point d'un solvant convenable dans un temps relativement bref.

La chromatographie en couches minces est avant tout une chromatographie d'adsorption dans le cas des substances lipophiles. Parfaitement adaptée à ce type de séparation, elle a fait l'objet de nombreuses publications. Appliquée aux 17-cétostéroïdes elle permet la séparation des principaux métabolites éliminés dans l'urine : l'androstérone, la D.H.A., l'étiochlanolone, les 11-oxy 17-cétostéroïdes.

IV. — LA SUBLIMATION

La sublimation est le changement d'état d'un corps pur cristallisé et la recondensation du gaz directement à l'état de cristaux sans passer apparemment par l'état liquide.

Cette méthode a été souvent employée pour purifier de nombreuses substances.

L'état physique d'un corps pur dépend des conditions de température et de pression. Si on porte sur un graphique l'état de ce corps en fonction de la température et de la pression, on détermine trois zones ; chacune correspond à l'un des trois états possibles : solide, liquide, gazeux (voir Figure n° 5).

Sur ce graphique on remarque un point particulier : c'est l'intersection des courbes qui délimitent les aires correspondant aux trois états possibles.

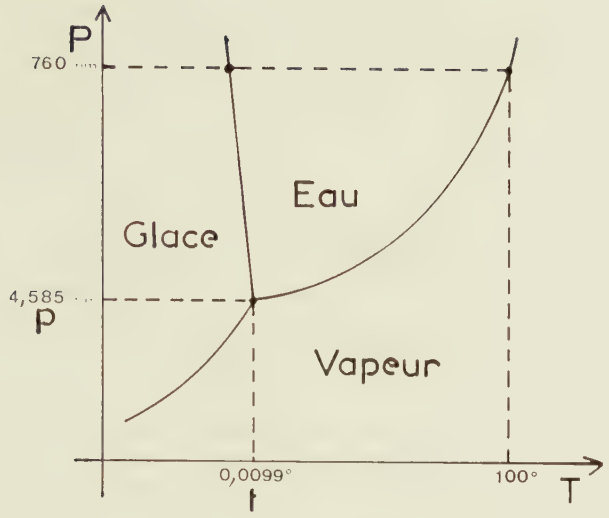


FIGURE N° 5

Graphique complet des états d'un corps pur (ex. H20).

A la température et à la pression définissant ce point, les trois états peuvent coexister ; c'est le point triple. De plus, on remarque que le passage direct de l'état solide à l'état gazeux peut se faire à température ou à pression constante.

Si on opère à pression fixe, une augmentation de température amène le corps à l'état gazeux. Pour obtenir une sublimation, il faut que la pression soit inférieure à la pression (p) qui correspond au point triple. Si on opère à une pression supérieure il y a d'abord fusion.

Si on opère à température constante, un abaissement de pression provoque la sublimation à condition que la température soit inférieure à la température (t) du point triple. A température supérieure, il y a évaporation.

JAYLE et EMILIOZZI (30) ont utilisé ce procédé avec succès pour purifier des quantité de stéroïdes de l'ordre de 100 µg provenant d'éluats de chromatographie sur papier.

V. — PHYSIOPATHOLOGIE DES 17-CETOSTEROIDES

Chez l'homme des 17-cétostéroïdes sont d'origine corticosurrénalienne et testiculaire. La surrénale est responsable des 2/3 de la production journalière totale. 1/3 correspond à la contribution du testicule. Chez la femme l'activité androgénique de la corticosurrénale est seule responsable de l'élimination des 17-cétostéroïdes (voir Fig. n° 3).

Nous avons rassemblé dans le tableau n° 2 les taux (en milligrammes) d'élimination journalière des principaux 17-cétostéroïdes à savoir :

— l'androstérone

— l'étiocholanolone

— la D.H.A.

— les 11-céto-17-cétostéroïdes et les 11-hydroxy-17-cétostéroïdes.

TABLEAU 2

Elimination journalière (en mg) des principaux 17-étostéroïdes chez l'homme et la femme

	17 CS totaux	D. H. A.	Andro stérone	Etiocho lanolone	11-C 17-CS	11-OH 17-CS
Homme ..	15,6	2,09	5,56	5,3	0,76	1,51
Femme ...	12,6	1,50	3,50	3,2	1,17	2,27

A) Métabolisme et Catabolisme

a) HORMONES D'ORIGINE SURRENALIENNE

La corticosurrénale sécrète des hormones androgènes qui sont l'androstérone, la 11-hydroxyandrostérone et la D.H.A. On les retrouve dans le sang obtenu par ponction veineuse de la glande. Leur précurseur immédiat est la 5-pregnenolone. Cette dernière provient directement du cholestérol par section de la chaîne latérale de celui-ci, entre les atomes C-20 et C-22 sous l'action du système enzymatique complexe de la cholestéroldes molase.

A ce niveau intervient la corticotrophine hypophysaire ou A.C.T.H. qui joue un rôle direct dans la transformation du cholestérol en 5-prégnenolone. Une hypophysectomie ou une destruction pathologique de l'hypophyse entraîne une chute considérable de l'élimination d'A.C.T.H. et provoque une élimination élevée de ces mêmes stéroïdes.

La delta-5-prégnenolone se transforme ensuite en D.H.A. laquelle donne l'androsténedione, d'où dérive la 11-hydroxyandrostenedione.

Les étapes biologiques suivantes consistent en la métabolisation de ces hormones au niveau du foie. Elles conduiront à leur inactivation et à leur conjugaison, celle-ci ayant pour but d'augmenter leur solubilité en phase aqueuse et de faciliter leur élimination. C'est ainsi que l'on note tout d'abord la transformation de l'androstérone en étiocholanolone et androstérone, ainsi que le

passage de la 11-hydroxyandrostènedione en divers 17-cétostéroïdes oxygénés dont le plus important est la 11-β-hydroxyandrostérone. En ce qui concerne la D.H.A. une fraction est éliminée directement alors que l'autre est métabolisée selon une voie analogue à celle suivie par l'androsténedione. Tous ces métabolites sont transformés en dérivés glycurono- ou sulfo-conjugués.

Dans leur ensemble les 17-cétostéroïdes surrénaliens ont un pouvoir androgénique faible (DHA, étiocholanolone, androstérone), voire même nul (stéroïdes 11-oxygénés). Bien que l'apparition des 17-cétostéroïdes surrénaliens à la puberté ainsi que certains faits cliniques que nous allons rappeler plaident en faveur d'une fonction androgénique de la glande, il est difficile de conclure d'une manière absolue à une sécrétion réelle d'androgènes. Chez la fille, une hyperplasie congénitale des surrénales provoque une virilisation profonde : c'est le pseudo-hermaphrodisme. Chez le garçon dans les mêmes conditions, on assiste à un syndrome de macro-génitosomie précoce. On observe dans les deux cas une augmentation considérable du taux d'élimination urinaire des 17-cétostéroïdes. Celle-ci massive, peut être freinée par l'administration de corticostéroïdes de synthèse. Une élimination excessive de 17-cétostéroïdes s'observe dans les cas de virilismes tardifs dus à une hyperplasie des corticosurrénales ou à des tumeurs virilisantes de cette glande. On tend à penser actuellement à une production de stéroïdes anormaux par anomalies enzymatiques entravant la voie normale de la biosynthèse des stéroïdes surrénaliens.

b) HORMONES D'ORIGINE TESTICULAIRE

Le tiers des 17-cétostéroïdes a pour origine une sécrétion testiculaire. Les hormones (testostérone, androsténedione et androstérone) sont secrétées sous l'action des gonado-stimulines hypophysaires et en particulier de la gonado-stimuline B. Cette dernière agit plus particulièrement sur les cellules de Leydig, produisant la testostérone.

Les hormones liées aux protéines plasmatiques sont transportées au foie par la voie sanguine. A l'égal des androgènes surrénaux, elles seront inactivées par les systèmes enzymatiques hépatiques. La testostérone est métabolisée en andros-4-ène 3,17-dione et secondairement en ses deux catabolites principaux : l'androstérone et l'étiocholanolone, ainsi qu'en épiandrostérone, mais en faible quantité. Le rein assure l'élimination de ces hormones sous forme de glycuronoconjugués.

En résumé, on peut dire que toutes les hormones mâles extractibles de l'urine sont des 17-cétostéroïdes. Ceux-ci ne sont pas les hormones elles-mêmes, mais leurs métabolites. On constate aussi que le dosage global des 17-cétostéroïdes reflète plus l'activité de cette dernière n'ayant qu'un faible retentissement sur les variations de l'ensemble de ces composés. L'élimination implique,

non seulement l'activité des glandes productrices mais aussi celles de l'hypophyse et de la cellule hépatique.

B) Pathologie de la surrénale et du testicule

a) LA SURRENALE

Les troubles de la glande surrénale se traduisent par un hypo- ou un hyper-fonctionnement que nous envisageons successivement.

1) *Hypofonctionnement surrénalien.* — Le syndrome principal est la maladie d'Addison. Secondaire à une tuberculose entraînant, dans la majorité des cas, une destruction caséeuse des surrénales, elle peut provenir également d'une rétraction corticale ou atrophie simple de la surrénale en relation, semble-t-il, avec un hypofonctionnement pituitaire.

Au point de vue symptomatologique, on observe une asthénie musculaire intense et une hypotension, des troubles digestifs et des douleurs abdominales. Ses symptômes s'accompagnent de troubles génitaux tels que l'impuissance et une aménorrhée chez la femme. On note amaigrissement important ainsi qu'une mélanodermie.

Un autre type d'hypofonctionnement correspond à l'insuffisance surrénale aiguë. Celle-ci peut être primitive, au cours d'une tuberculose latente des surrénales ou d'une surrénalite d'origine inconnue. Elle peut être secondaire à une maladie infectieuse. Trois formes symptomatologiques sont observées : une forme gastro-intestinale, une forme nerveuse et une forme cardio-vasculaire.

2) *Hyperfonctionnement surrénalien.* — Parmi les syndromes d'hyperpérinéphrie corticale, nous citerons tout d'abord la maladie de Cushing. Au point de vue étiologique, elle est due soit à un adénome basophile hypophysaire dans lequel la sécrétion d'A.C.T.H. est augmentée, soit à une tumeur bénigne ou maligne des surrénales. Le syndrome de Cushing se traduit par un hypercorticisme. On observe une obésité portant sur toutes les parties du corps. Des vergetures pourprées apparaissent sur le ventre, les cuisses et le tronc du malade. On note une hypertension, une ostéoporose, de l'hypertricose et dans 1/4 des cas un diabète sucré. Ces signes s'accompagnent d'un syndrome vasculo-sanguin.

L'hyperpérinéphrie corticale comprend également les hypercorticismes androgéniques : syndrome génito-surrénal acquis et hyperplasie congénitale ou maladie de Wilkins.

Dans le cadre du syndrome génito-surrénal acquis, on peut observer une formule non tumorale qui se traduit par une hypertricose et des troubles des règles : c'est l'hirsutisme pur. On peut également observer chez la femme le syndrome génito-surrénal

à la suite du développement d'une tumeur surrénalienne le plus souvent maligne et apparaissant entre 30 et 45 ans. On note un virilisme avec aménorrhée et hypertricose. Les signes secondaires sexuels changent : hypertrophie du clitoris, augmentation de la force musculaire, la voix et le caractère deviennent de type masculin. Dans quelques cas, il existe une obésité, une sécheresse de la peau, des vergetures et une hyperglycémie. Ce syndrome est très rare chez le garçon ; chez la fille après l'âge de 12 ans on a le plus souvent affaire à une tumeur.

L'hyperplasie congénitale ou maladie de Wilkins apparaît aussi bien chez la fille que chez le garçon. Lorsqu'il s'agit d'une fille, le syndrome se traduit par une augmentation du clitoris et des caractères sexuels masculins. Ce tableau, voisin de celui d'une tumeur, se développe tôt dans l'enfance. Chez le garçon on observe une puberté précoce.

b) LE TESTICULE

Au niveau du testicule on assiste surtout à des syndromes d'insuffisance hypophysaire.

L'eunuchisme apparaît après une castration bilatérale. L'augmentation de la croissance s'accompagne de l'absence de pilosité et du développement des organes génitaux. La voix ne mue pas. Ces signes se complètent d'une obésité du type gynoïde. Dans l'eunuchoïdisme, le tableau est moins complet. Il s'agit de lésions précoces infectieuses ou traumatiques. Chez les cryptorchides se développe aussi un ensemble de signes d'insuffisance testiculaire. Une castration tardive entraîne un syndrome d'hypogonadisme tardif avec régression des caractères sexuels secondaires. Une insuffisance testiculaire spontanée peut s'observer entre 40 et 50 ans : c'est l'infantilisme réversif de Gandy dans lequel l'hypophyse joue un rôle important.

C. — VARIATIONS DE LA 17-CETOSTEROIDURIE A L'ETAT NORMAL ET PATHOLOGIQUE

(Explorations fonctionnelles)

En moyenne, l'excrétion urinaire normale des 17-cétostéroïdes est de 10 à 24 mg par jour chez l'homme et de 6 à 14 mg par jour chez la femme. A un an, l'excrétion est faible, de l'ordre de 0,5 mg/jour, puis elle atteint 1 mg/jour à 5 ans pour arriver à 10 mg/jour à 10 ans. Le taux normal est obtenu à la puberté. Les taux les plus élevés se rencontrent chez l'homme entre 20 et 40 ans et chez la femme entre 18 et 35 ans. L'ecrétion décroît avec la perte de l'activité sexuelle.

En clinique la connaisance de la valeur de l'excrétion des 17-cétostéroïdes totaux présente un grand intérêt mais l'orientation du diagnostic doit être étayée d'une exploration plus complète. Cele-ci aurla trait à des déterminations portant sur les différentes fractions de 17-cétostéroïdes (dosages partiels) et sur les autres groupes de stréroïdes et en particulier les corticostéroïdes. On pourra aussi s'adresser à une exploation fonctionnelle par stimulations ou freinages selon le cas. Les différents syndromes décrits provoquent une hypo- ou une hyper-élimination des 17-cétostéroïdes : ces modifications traduisent des phénomènes différents selon le sexe et l'origine glandulaire.

L'absence totale de surrénale entraîne chez la femme une excrétion nulle de stéroïdes puisque ceux-ci sont d'origine exclusivement surrénale. Chez l'homme, le taux tombe au voisinage de 5 mg/jour si les deux testicules sont intacts. Les insuffisances testiculaires n'interviennent que peu en raison de la faible contribution de ces glandes à la masse globale des 17-cétostéroïdes. Par contre, les différents types d'affections se rapportant aux surrénales se traduisent par des modifications notables.

Toutes les affections conduisant à une chute de la sécrétion surrénalienne : maladie de foie et de la thyroïde, entraînent une diminution de l'élimination. La maladie d'Addison et les insuffisances surrénaliennes secondaires à un hypopituitarisme sont toujours accompagnées d'une diminution à la fois des 17-cétostéroïdes et de la sécrétion surrénalienne des corticostéroïdes.

L'hyperplasie congénitale ou maladie de Wilkins présente en ce sens une exception. On assiste à une augmentation du taux des 17-cétostéroïdes et du prégnandiol éliminés ainsi qu'à une diminution de l'excrétion des hydroxycorticoïdes urinaires. L'hyperplasie est due au trouble de la biogénèse de l'hydrocortisone, au niveau de la 21-hydroxylase qui transforme la 17-hydroxyprogrestérone en cortisol. La sécrétion de la cortisone est diminuée et entraîne une hyper sécrétion de l'A.C.T.H. par défreination hypophysaire. La conséquence en est l'hypersécrétion des androgènes.

L'hypo-activité surrénalienne s'accompagne d'une hypo-élimination de 17-cétostéroïdes, l'inverse n'est pas systématiquement vrai. On assiste souvent à une absence de corrélation entre l'excrétion des 17-cétones et une hyperactivité surrénalienne, explicitée par l'augmentation de la teneur plasmatique ou urinaire en corticostéroïdes.

Dans le syndrome de Cushing, l'augmentation des 17-cétostéroïdes n'est pas constante et, si elle existe, son intensité est variable. Par contre, dans les tumeurs malignes de la corticosurrénale, l'augmentation de la 17-cétostéroïdurie est très importante. Ici, le dosage des différentes fractions individualisées en particulier celui de la D.H.A. présente une grande valeur clinique.

Il n'en demeure pas moins que dans la plupart des cas le diagnostic sera assuré par des méthodes d'exploration dynamiques

de stimulation ou de freinage des sécrétions testiculaires ou surrénaliennes, s'accompagnant de déterminations portant sur les variations des 17-cétostéroïdes totaux ou mieux par des déterminations portant sur les substances individualisées.

a) EXPLORATION DYNAMIQUE PAR STIMULATION

Les androgènes surrénaliens sont sécrétés sous l'influence de l'A.C.T.H. C'est donc celle-ci que l'on utilise dans les épreuves de stimulations. L'administration de cette hormone à un individu normal entraîne une augmentation de l'élimination des 17-cétones portant sur la fraction surrénalienne. L'A.C.T.H. est injectée par voie intraveineuse, car par voie intramusculaire on observe des irrégularités individuelles de résorption et d'inactivation. Dans la maladie d'Addison, on n'obtient pas de réponse après action de l'A.C.T.H. Il est même dangereux de pratiquer ce test chez le malade grave, on risque de provoquer l'insuffisance aiguë par épuisement brusque des surrénales. Dans les cas d'hyper-élimination, comme dans les tumeurs malignes des surrénales, ces dernières ne peuvent être stimulées par l'hormone hypophysaire, la réponse au test est négative.

A l'opposé l'A.C.T.H. entraîne une augmentation de la 17-cétostéroïdes très importante dans le syndrome de Cushing dû à un adénome ou une tumeur bénigne. Cette augmentation est parallèle à celle des 17-hydroxycorticoïdes. La réponse est différente dans l'hyperplasie surrénalienne congénitale. On obtient bien une augmentation de l'élimination des 17-cétones mais sans assister à une élévation de la sécrétion des 17-hydroxycorticostéroïdes.

Dans les cas d'hypercorticisme androgéniques comportant une élémination de base normale, l'action de l'A.C.T.H. se traduit par une augmentation presque exclusive de la D.H.A. (JAYLES).

b) EXPLORATION DYNAMIQUE PAR FREINAGE

WILKINS, en 1950, a montré que la cortisone avait le pouvoir d'inhiber la sécrétion d'androgènes d'origine surrénalienne. Plus tard, il fut établi que d'autres corticoïdes naturels et de synthèse possèdent une activité analogue consécutive à l'inhibition de la sécrétion hypophysaire d'A.C.T.H.

Plusieurs composés synthétiques, dépourvus d'activité secondaire ,en particulier hydro-électrolytique, sont doués d'un pouvoir antiphlogitique et hypophysofreinateur supérieur à celui de la cortisone. Ce sont :

— la deltacortisone ou prégnisolone

— la 9 α-fluoroprégnisolone

— la 16 α-méthyl, 9 α-fluoroprégnisolone ou dexamétasone

Le pouvoir hypophysofreinateur de cette dernière est trente fois supérieur à celui de la prégnisolone, de ce fait c'est la dexaméthasone qui a reçu le plus d'application en clinique. On administre ce fluorostéroïde pendant cinq jours à raison de 3 mg/jour. On effectue le posage des 17-cétostéroïdes avant la première injection et le dernier jour de l'administration. On enregistre une baisse importante de l'élimination des 17-cétones chez le sujet normal. Celle-ci atteint une valeur de 1,5 mg/jour chez la femme et de 6 à 7 mg/jour chez l'homme.

Ce test est très utile dans l'examen des malades atteints du syndrome de Cushing et du syndrome génito-surrénal acquis. Dans ces deux cas, on n'observe pas de diminution dans l'élimination, surtout s'il s'agit d'une tumeur maligne. La 17-cétostéroïdurie est par contre, fortement diminuée chez la femme dans les cas d'hyperplasie surrénale congénitale et dans certains virilismes acquis. Ces derniers peuvent donc être différenciés des virilismes d'origine ovarienne chez lesquels l'administration de dexamétasone ne conduit qu'à une chute partielle de l'élimination des 17-cétostéroïdes.

On a dernièrement proposé la métopyrone (SU-4885 ou 2-méthyl-1,2 (3 pyridil) 1-propanone) comme inhibiteur sélectif des mécanismes de la 11 α-hydroxylation au niveau du cortex surrénal. Cette inhibition a pour conséquence l'arrêt de la synthèse du cortisol et pour corollaire une surproduction de ses précurseurs immédiats. Ceci traduit par l'élévation de la teneur en 11-désoxycortisol substance S) suivie de l'apparition dans le plasma et dans l'urine des métabolites 21-11-désoxy et tout particulièrement de tétrahydro-S (T.H.S.). VAGUE et coll. (17) ont administré la métopyrone à des sujets à surrénales et hypophyse cliniquement et biologiquement normales et ont observé une augmentation moyenne de 183 p. 100 de la valeur des 17-cétostéroïdes éliminés.

De l'ensemble des considérations que nous venons de présenter, il ressort essentiellement que l'étude de la 17-cétostéroïdurie globale, si elle permet d'orienter le diagnostic, ne peut, à elle seule, le préciser. Il est nécessaire que le laboratoire fournisse au clinicien l'évaluation de l'élimination des différents constituants de la fraction stéroïdique 17-cétonique, soit sans, soit après divers tests d'exploration biologique, ce qui permet d'apporter des renseignements d'une très grande valeur.

OBJET DU TRAVAIL

Parmi les stéroïdes éliminés dans les urines, les composés possédant un groupement fonctionnel cétone sur le carbone -17 présentent un intérêt notable ; ils proviennent du métabolisme de diverses classes hormonales : corticostéroïdes, androgènes, lutéostéroïdes. La variation de leur élimination est l'image des troubles des glandes qui les sécrètent ,des stimulations chimiques hypophysaires ou bien des organes qui les métabolisent.

La détermination de la 17-cétostéroïdurie globale apporte un renseignement précieux au clinicien. Cependant, il n'en demeure pas moins que l'analyse qualitative et quantitative des différentes fractions, qui les composent, permet d'étayer plus sûrement un diagnostic. Les méthodes mises en œuvre jusqu'à ce jour, si elles répondent au but que nous venons de préciser, sont longues, délicates et nécessitent un matériel important et un personnel particulièrement averti. Aussi avons-nous cherché à étudier une méthode simple, permettant une analyse rapide et aussi spécifique que possible des 17-cétostéroïdes.

Parmi les différentes opérations qui conduisent à l'analyse des constituants stéroïdique de la fraction 17-cétone, la purification est un des temps les plus importants et les plus délicats. Après hydrolyse et extraction, la plupart des auteurs font un lavage par des solutions alcalines et par l'eau. Ces extraits sont suffisamment purs pour procéder à un dosage global ; mais les méthodes chromatographiques montrent un grand nombre d'impuretés néfastes à la mise en évidence et à la séparation des différentes fractions des 17-cétostéroïdes. Cette purification peut comporter une nouvelle extraction par un autre solvant (41) un partage entre le benzène et 50 % de méthanol dans l'eau (54) ou une chromatographie simple Les systèmes de chromatographie employés sont soit la chromatographie en couche minces (35), soit une chromatographie sur colonne de silicagel (52) ou d'alumine (25), soit une chromatographie simplifiée sur papier (58). Certains auteurs ont utilisé aussi la réaction de GIRARD ou la précipitation par la digitonine (54).

Dans la première partie de nos recherches, après avoir hydrolysé et extrait les 17-cétostéroïdes par une méthode classique, nous nous sommes appliqués à purifier les extraits par un procédé rapide et simple : la sublimation. Dans le dispositif que nous avons adopté, une basse pression est rapidement établie et maintenue à une valeur constante. C'est l'élévation progressive de la température du corps après son introduction dans l'appareil qui provoque la sublimation.

Dans la deuxième partie, nous avons chromatographié les extraits, après sublimation, sur couches minces selon STAHL. Nous avons alors, comparé les documents obtenus par enregistrement des chromatoplaques : les stéroïdogrammes urinaires (39) des extraits non sublimés et sublimés. Nous avons appliqué cette méthode à l'analyse d'urines d'hommes et de femmes normaux.

En résumé, on trouvera dans notre thèse la description des techniques que nous avons mises au point, leur justification et les documents qui ont été, grâce à elles, établis.

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE PREMIER

PREPARATION DES EXTRAITS URINAIRES

Nou avons indiqué, dans ce chapitre, les méthodes que nous avons utilisées, pour l'hydrolyse des formes conjuguées des 17-cétostéroïdes et l'extraction de ces 17-cétostéroïdes libérés (29).

Nous avons opéré sur les urines de 24 heures d'hommes et de femmes normaux.

A) HYDROLYSE

On introduit dans un ballon rodé 1/20e des urines de 24 heures. On additionne ces urines de 10 % de HCl concentré (v/v). On fait bouillir la liqueur, sous réfrigérant à reflux, pendant 10 minutes.

B) EXTRACTION DES 17-CETOSTEROIDES

L'hydrolysat, refroidi sous un filet d'eau froide, est introduit dans une ampoule à décanter avec le même volume de chlorure de méthylène. On agite fortement pendant quelques minutes. Après séparation des deux phases, on recueille la phase organique inférieure dans une deuxième ampoule à décanter, on ajoute le même volume de NaOH N, on agite quelques minutes. Après

décantation, on recueille la phase organique ; celle-ci est évaporée à sec sous pression réduite au bain-marie.

Le résidu est repris par 1 ml d'éthanol absolu, exempt d'aldéhydes.

L'extrait éthanolique est alors divisé en deux fractions égales : sur une fraction nous effectuons une purification par sublimation ; sur la deuxième nous effectuons directement un dosage colorimétrique et une chromatographie en couches minces.

Les dosages sont effectués sur 0,2 ml d'extrait alcoolique.

Pour la chromatographie, nous déposons des spots de 20 µl d'extrait alcoolique.

CHAPITRE II

LA SUBLIMATION DES 17-CETOSTEROIDES

En vue d'obtenir des extraits urinaires suffisamment purs et pour identifier plus facilement les différentes fractions des 17-cétostéroïdes urinaires, nous avons utilisé la sulimation.

Nous avons alors étudié et mis au point un appareillage simple, permettant une récupération facile et totale des 17-cétostéroïdes sublimés. Ensuite nous avons cherché systématiquement la température de chauffage, qui nous permettait d'obtenir un pourcentage maximum de récupération des 17-cétostéroïdes purs en solution éthanolique.

Nous avons, enfin, appliqué cette méthode aux extraits urinaires.

A) APPAREILLAGE

L'appareil, sur lequel nous avons pratiqué nos essais est composé d'une enceinte chauffante et d'un tube de verre, dans lequel se trouve la subtance à sublimer, relié par un rodage sphérique, à un long tube étroit dans lequel se condensent les vapeurs ; ce dernier est relié à une pompe à vide. Le montage de cet appareil est schématisé dans la figure N° 6.

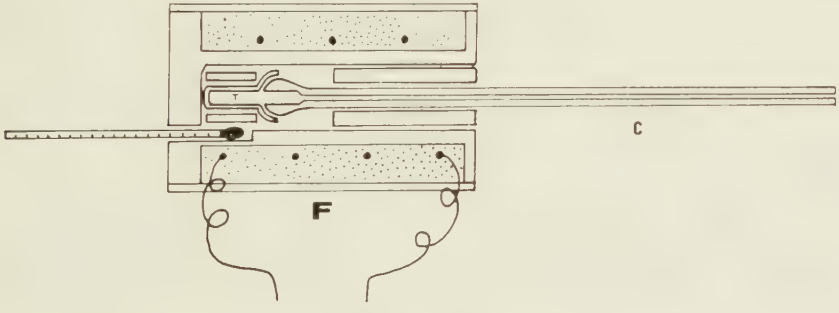


FIGURE N° 6

Schéma de l'appareil utilisé pour la sublimation des 17-cétostéroïdes urinaires.

— L'enceinte chauffante (F) est composée d'un cylindre en aluminium de 35 mm de diamètre et de 150 mm de long entouré d'une couche d'amiante de 30 mm d'épaisseur ; le tout est contenu dans un autre cylindre en aluminium également. Une résistance électrique, noyée dans l'amiante, entoure le premier cylindre ; elle est reliée à un thermostat permettant de régler la température. Un orifice dans lequel se loge un thermomètre est percé jusqu'au niveau de l'enceinte.

— La substance à sublimer se trouve dans un petit tube (T) de verre, de 8 mm de diamètre intérieur et de 35 mm de long. Il est relié par un rodage sphérique à un tube (C) de 300 mm de long, dont le diamète intérieur est de 2 mm et le diamètre extérieur de 9 mm. Pour que le rodage soit étanche, il est enduit de graisse de silicone et maintenu en place par deux petits ressorts.

— Lorsqu'on veut faire sublimer une substance, on relie le tube (T), contenant cette substance au tube (C). On glisse autour du tube (T) un petit cylindre en aluminium permettant une meil leure répartition de la chaleur. L'ensemble est alors introduit dans l'enceinte chauffante ; celle-ci est obturée par un cylindre en aluminium de 34 mm de diamètre sur 80 mm de long, percé d'un orifice de 10 mm de diamètre, entourant le tube (C). Le tube (C) sort de l'enceinte chauffante sur une longueur de 20 mm ; l'extrémité de ce tube est reliée à une pompe à vide créant une pression inférieure à 1 mm de mercure à l'intérieur des tubes. Un gradient de température s'établissant entre la partie du tube (C) située dans l'enceinte chauffante et la partie se trouvant à l'extérieur, entraîne la formation d'anneaux de cristallisation.

B) SUBLIMATION DES 17-CETOSTEROIDES URINAIRES

Après de nombreux essais systématiques sur des 17-cétostéroïdes purs en solution alcoolique, nous avons adopté la température de chauffage de 250°C. Celle-ci permet une récupération de 100 % de la substance sublimée.

L'extrait urinaire (0,5 ml de solution alcoolique) est introduit dans le tube (T), dans lequel un petit morceau de coton de verre a été tassé. On évapore à sec au bain-marie bouillant. On place ensuite dans le tube un petit morceau de canne de verre de 55 mm de long. L'ensemble est alors adapté au tube (C) ; le morceau de canne de verre est calé par un deuxième morceau de coton de verre.

L'ensemble est introduit dans l'enceinte chauffante (F), celle-ci ayant été chauffée au préalable à 250°C ; cette dernière est alors obturée et le tube (C) branché sur la pompe à vide. On abandonne ainsi l'ensemble pendant 30 minutes.

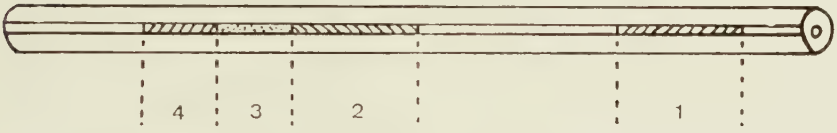
A ce moment, on sort le tube de l'appareil ; on le laisse refroidir à la température du laboratoire. Le tube (C), dans lequel se sont formés plusieurs anneaux de cristallisation, est séparé du

tube (T) et monté sur un support. L'extrémité supérieure du tube (C) est branchée sur une seringue d'aspiration ; son extrémité inférieure plonge dans un tube à hémolyse contenant 0,5 ml d'éthanol exempt d'aldéhydes. Le liquide est aspiré plusieurs fois dans le tube ; les anneaux de cristallisation sont dissous dans l'éthanol. La concentration en 17-cétostéroïdes est alors la même qu'au départ.

Un dosage colorimétrique sera effectué sur 0,2 ml de cette solution et des spots de 20 µl seront déposés pour une chromatographie en couches minces.

Des anneaux de cristallisation de différentes couleurs (voir figure n°7) sont nettement visibles dans le tube (C). Nous avons assayé de dissoudre séparément chacun de ces anneaux, mais dans toutes les fractions nous avons retrouvé des 7-cétostéroïdes.

FIGURE N° 7



Portion du tube (C) avec les anneaux de cristallisation : n° 1 : anneau orange situé à 11,5 cm de l'extrémité du tube (C) ; n° 2 : anneau jaune situé à 18 cm de l'extrémité du tube (C) ; n° 3 : anneau bleu situé à 20,5 cm de l'extrémité du tube (C) ; n° 4 : anneau violet situé à 22 cm de l'extrémité du tube (C).

CHAPITRE III

DOSAGE ET CHROMATOGRAPHIE EN COUCHES MINCES DES 17-CETOSTEROIDES URINAIRES AVANT ET APRES SUBLIMATION

Dans ce chapitre, nous avons dosé par la méthode de ZIMMERMANN les 17-cétostéroïdes dans les extraits urinaires avant et après sublimation afin de savoir si cette méthode de purification permet une récupération totale de ces stéroïdes.

Ensuite ces extraits ont été chromatographiés sur couches minces selon STAHL, et enregistrés afin d'obtenir un stéroïdogramme. Les extraits urinaires de trois urines d'homme et de trois urines de femme ont été ainsi analysés, avant et après sublimation. Nous avons obtenu douze documents nous permettant de comparer la pureté des extraits bruts et des extraits sublimés.

A) DOSAGE COLORIMETRIQUE DES 17-CETOSTEROIDES

Les 17-cétostéroïdes, contenus dans les extraits urinaires sont dosés par la méthode de ZIMMERMANN.

1) *Méthode de dosage.* — On ajoute à 0,2 ml de solution contenant de 30 à 80 µg de 17-cétostéroïdes, 0,2 ml d'une solution à 2 g de métadinitrobenzène dans 10 0ml d'éthanol purifié, puis 0,2 ml d'une solution aqueuse de potasse 5N. Ces deux solutions étant préparées extemporanément. Le milieu soigneusement homogénéisé est abandonné 30 minutes à l'étuve à 37°C à l'abri de la lumière. Au bout de ce temps, on ajoute à chaque essai 2 ml d'éthanol à 30 % et 5 ml d'éther sulfurique. L'extraction de la coloration se fait pour chaque tube 1 minute avant la lecture photométrique. Les deux phases se séparent rapidement sans fournir d'émulsion. La phase éthérée surnageante est rose bleutée franc. On la transvase dans la cuve du photomètre et on détermine l'intensité de l'absorption de la coloration sous 10 mm d'épaisseur e tpour une longueur d'onde de 520 mµ.

La valeur déterminée est reportée sur une coube d'étalonnage construite en portant en abscisses les quantités connues de 17-cé-

tostéroïdes. Cette courbe est établie pour chaque série de dosages. Pour cela, nous préparons une solution de 15 mg de DHA dans 20 ml d'éthanol. Au moyen du même solvant, nous réalisons une série de dilutions permettant d'avoir des solutions de stéroïde contenant de 30 à 120 µg pour 0,2 ml. Sur chacune d'elles on effectue la réaction de ZIMMERMANN telle que nous venons de la décrire. Un essai témoin est réalisé en remplaçant la solution de stéroïde par un égal volume d'éthanol. Nos résultats sont donc exprimés arbitrairement mais classiquement en DHA.

Soulignons que la qualité de l'éthanol employé pour la préparation des réactifs et des solutions a une grande importance, il doit être en particulier exempt d'aldéhydes. A cette fin, nous traitons 100 ml d'éthanol absolu par 2 g de poudre de zinc et 2 g de pastilles de potasse. L'éthanol récupérée par distillation est conservé au maximum pendant une huitaine de jours, dans un flacon coloré bouchant à l'émeri.

2) *Résultats.* — Nous avons rassemblé dans le tableau n° 3 les résultats de dosage des 17-cétostéroïdes présents dans 3 urines d'hommes normaux et 3 urines de femmes normales. Ces dosages ont été faits sur des extraits bruts et sur des extraits sublimés. Les quantités de 17-cétostéroïdes, éliminés en 24 heures, sont exprimés en mg de DHA.

TABLEAU 3

Comparaison des teneurs en 17-cétostéroïdes (en mg/24 heures) des extraits urinaires avant et après sublimation.

Echantillon n°	Avant sublimation	Après sublimation
1	9	9,6
2	6,5	7,2
3	6,8	7
4	8,6	9
5	6	6,4
6	4,8	5,2

L'examen de ce tableau montre que la quantité de 17-cétostéroïdes, dosée après sublimation, paraît plus élevée que celle dosée dans les extraits bruts. La purification, due à la sublimation permet d'obtenir des extraits plus propres, contenant moins de substances parasites masquant la coloration du pigment, obtenu par la réaction des 17-cétostéroïdes avec le métadinitrobenzène en présence de potasse. Les extraits urinaires, obtenus après sublimation, sont moins riches en pigments et beaucoup plus convenables à la chromatographie en couches minces, comme nous le verrons plus tard

B) CHROMATOGRAPHIE EN COUCHES MINCES DES 17-CETOSTEROIDES

1) *Technique de chromatographie.* — Nous avons utilisé des plaques de verre à faces parallèles (glace) de 10/20 cm. Ces plaques sont recouvertes d'une couche de Kieselgel G d'après STAHL (Merk's reagenzien) de 0,250 mm. et activées pendant une heure à l'étuve à 140° C.

Le solvant de migration est le suivant : benzène-éthanol (85 - 15) (v/v).

20 µl de chaque extrait alcoolique sont déposés sur une ligne de départ, située à 2 cm. du bord inférieur de la plaque, à l'aide d'une microburette Prolabo.

La plaque ainsi chargée est déposée verticalement dans une cuve de verre dont le fond est garni d'une couche de solvant de 1 cm. d'épaisseur. On obture la cuve à l'aide d'une plaque de verre et on laisse le solvant migrer jusqu'à ce qu'il ait atteint une hauteur de 12 cm. sur la plaque. On retire celle-ci, on évapore le solvant sous un léger courant d'air et on effectue la révélation des spots en pulvérisant sur la plaque le réactif suivant : on dissout 100 mg. de 2,4-dinitrophénylhydrazine dans une solution constituée de 90 ml d'éthanol absolu et de 10 ml d'acide sulfurique concentré. Après pulvérisation, la plaque est portée à l'étuve à 140.C pendant 15 minutes. On laisse la plaque refroidir à la température du laboratoire pendant 5 minutes. Puis le chromatogramme est enregistré selon un principe déjà appliqué à la chromatographie et à l'ionophorèse sur papier. Les spots des stéroïdes présents sur la plaque se traduisent par des courbes sur l'enregistrement. On obtient ainsi un stéroïdogramme.

2) *Comparaison des stéroïdogrammes urinaires.* — Les stéroïdogrammes urinaires ont été faits à partir d'extraits bruts et d'extraits sublimés d'urines d'hommes et de femmes nomaux. Ces stéroïdogrammes sont caractéristiques du sexe du sujet : nous avons donc présenté un stéroïdogramme d'homme et un stéroïdogramme de femme, comme exemple. Les figures n° 8 et n° 9 représentent quatre stéroïdogrammes.

Dans la figure n° 8 le premier stéroïdogramme est l'enregistrement de la chromatographie d'un extrait urinaire brut d'homme normal ; le deuxième correspond au même extrait urinaire, ayant été purifié par sublimation. Le troisième et le quatrième documents se trouvent dans la figure n° 9 ; ils sont relatifs aux extraits de la même urine de femme avant et après sublimation.

L'examen de ces graphiques montre un certain nombre de pics que nous avons essayé de reconnaître à l'aide de substances de référence. Nous avons ainsi utilisé des 17-cétostéroïdes purs, comme l'étiocholanolone, la déhydroépiandrostérone ou DHA et l'androstérone que nous avons chromatographiés sur les mêmes

plaques que les extraits urinaires. La valeur des Rf et la coloration des spots obtenus à l'aide de notre réactif nous ont permis de repérer les 11-oxy,17-cétostéroïdes. En effet selon notre technique de coloration, les 17-cétostéroïdes après s'être colorés en gris bleuté deviennent violets.

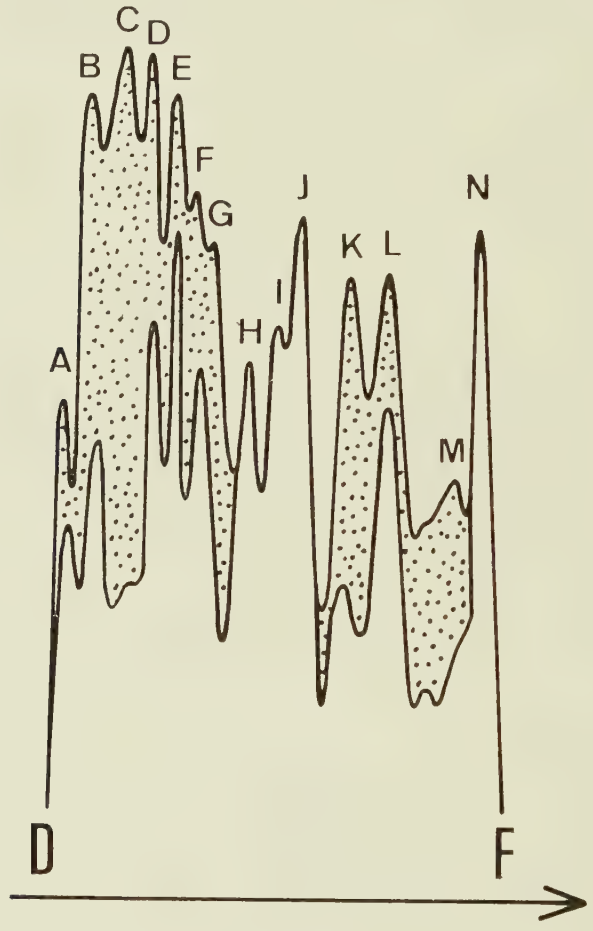


FIGURE N° 8

Stéroïdogramme d'homme : La courbe supérieure correspond à un extrait urinaire brut ; la courbe inférieure correspond à un extrait urinaire purifié par sublimation ; la partie pointillée représente ce qui a disparu au cours de la purification par sublimation.

On met en évidence sur les stéroïdogrammes ainsi obtenus à partir de l'extrait brut d'urine d'un homme normal, 14 pics que nous représentons par les lettres : A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N. Sur l'enregistrement du même extrait urinaire purifié

par sublimation nous ne retrouvons plus que 11 pics ; les pics C, G et M ont disparu. Les pics B, K et L, correspondant à des pigments urinaires ont nettement diminué. Les pics D, E et F plus

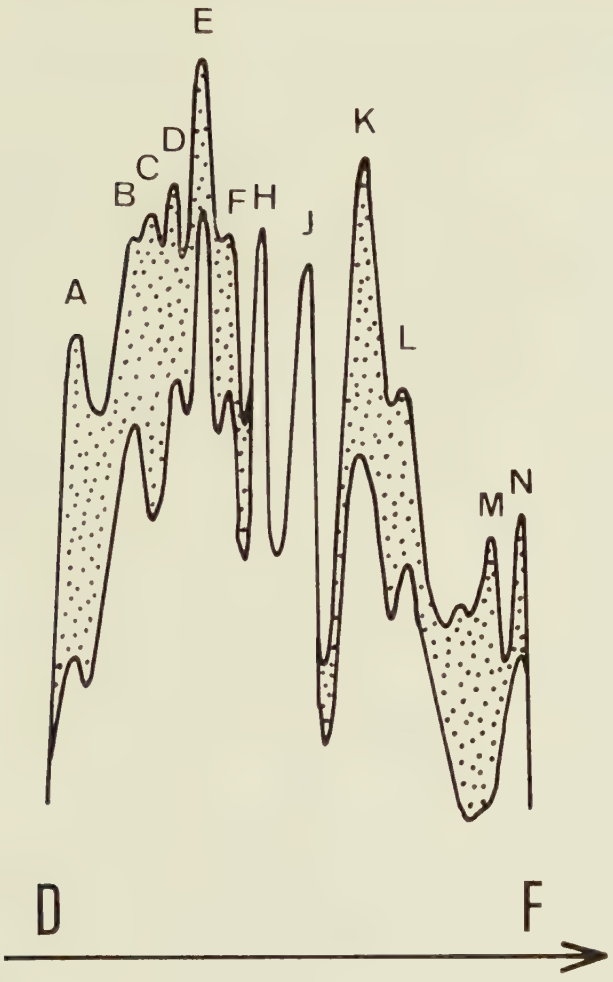


FIGURE N° 9

Stéroïdogramme de femme : La courbe supérieure correspond à un extrait urinaire brut ; la courbe inférieure correspond à un extrait urinaire purifié par sublimation ; la partie pointillée représente ce qui a disparu au cours de la purification par sublimation.

apparents sur le deuxième chromatographe, représentent les 11-oxy, 17-cétostéroïdes et les pics H, I et J correspondent aux trois principaux 17-cétostéroïdes urinaires, à savoir : l'étiocholanolone, la DHA et l'androstérone.

Sur le stéroïdogramme obtenu à partir d'un extrait urinaire brut d'une femme normale, nous retouvons les mêmes pics que précédemment, sauf les pics G et I ; ce dernier représentant la DHA. Ce 17-cétostéroïde se trouve en très faible quantité chez la femme et n'apparaît pas sur la chromatographie dans la technique que nous avons utilisée. De même que chez l'homme, après sublimation de l'extrait urinaire, le stéroïdogramme montre moins de pics ; les pics Cet M ont aussi disparu, de même les pics B, K et L. sont moins apparents.

La sublimation, en entraînant la diminution des pigments urinaires, et même la disparition d'autres substances paraît être une bonne méthode de purification. Elle permet ainsi au 17-cétostéroïdes urinaires d'apparaître de façon plus précise sur les stéroïdogammes.

CONCLUSION

Nous avons consacré à la rédaction de notre thèse une part importante aux différents aspects de la Chimie des stéroïdes hormonaux. Nous avons tenu à rappeler la structure des 17-cétostéroïdes ainsi que leurs propriétés physiques et chimiques. Leurs caractères les plus utiles à leur analyse ont fait l'objet d'une étude aussi exhaustipe que possible de notre part. Cela se conçoit aisément si l'on considère que notre problème a été essentiellement posé comme une question de biochimie analytique, consistant, en l'espèce, à apporter une contribution au perfectionnement des méthodes d'identification et de dosage des 17-cétostéroïdes urinaires.

En effet, il ressort de notre introduction que le dosage des 17-cétostéroïdes urinaires offre des difficultés qui ne sont pas toutes résolues de façon pleinement satisfaisante. Aussi bien est-on obligé, en l'état actuel de la technipue, de se contenter de méthodes qui donnent cependant de très précieuses indications aux cliniciens.

La clinique est en effet avide de tels résultats de laboratoire et cela en raison de l'importance des rôles des 17-cétostéroïdes en hormonologie. Aussi avons-nous jugé nécessaire de rappeler les propriétés biologiques des 17-cétostéroïdes en relation avec leur identification aux hormones corticales et sexuelles. Nous avons souligné que les produits de nature stéroïde résultant du métabolisme de ces hormones sont éliminés par les urines et sont bien le reflet du degré d'activité des glandes endocrines qui élaborent les hormones corticales et sexuelles proprement-dites.

Ce faisant, nous pensons avoir bien mis en évidence l'intérêt qui s'attache à des recherches visant à perfectionner les méthodes analytiques de séparation, de purification et de dosage des différentes substances appartenant aux groupes des 17-cétostéroïdes que l'on rencontre dans les urines humaines.

Nous avons vu que la détermination des 17-cétostéroïdes urinaires comporte, si l'on se borne à leur dosage d'une manière globale, trois étapes essentielles, à savoir :

1° - l'hydrolyse des urines ;

2° - l'extraction des stéroïdes libérés à la suite de cette hydrolyse ;

3° - une détermination colorimétrique pratiquée le plus souvent par la mise en œuvre de la réaction de Zimmerman.

Les deux premiers temps n'ont pas fait de notre part l'objet d'une étude systématique, si ce n'est que nous avons justifié les techniques que nous avons adoptées par une étude critique de celles proposées par les auteurs qui nous ont précédé dans cette voie. En effet, nos recherches ont essentiellement pour but de purifier les extraits urinaires afin d'éliminer au maximum les substances susceptibles d'interférer au stade du développement de la réaction colorée de Zimmerman. En outre, dans l'éventualité où l'on se propose d'effectuer une séparation chromatographique des 17-cétostéroïdes dans les extraits urinaires, il nous apparait que la qualité d'une telle séparation ne pouvait que s'améliorer si l'extrait avait lui-même bénéficié de la meilleure purification. Réciproquement, les méthodes de séparation chromatographique doivent être considérées comme susceptibles de témoigner de la valeur de la méthode de purification utilisée.

Pour purifier les extraits urinaires, nous avons pensé faire appel au phénomène de la sublimation. On sait que M.-F, Jayle et son école ont fait quelques essais dans ce domaine. Malgré leurs résultats favorables, ces auteurs n'ont pas poursuivi plus avant leurs recherches. Aussi avons-nous jugé intéressant de les poursuivre.

Notre travail a consisté tout d'abord en la mise au point d'un appareil convenablement adapté à la sublimation des stéroïdes extraits de l'urine. La description du dispositif que nous avons été conduit à adopter constitue une partie importante de notre travail. Nous pensons en outre qu'il représente l'amorce de recherches plus approfondies lorsqu'on se remémore que les stéroïdes se déposent dans les parties froides du tube de condensation sous forme d'anneaux bien cristallisés et souvent nettement séparés. A la suite de cette observation, nous nous sommes posé la question de savoir si ce phénomène ne représentait pas le premier du principe d'une nouvelle technique de séparation. Nous exprimons ici le regret de ne pas avoir disposé du temps nécessaire à pousser plus en avant nos recherches.

Par la suite, notre intérêt s'est polarisé sur l'analyse des produits que, dans cette première étape, nous étions parvenus à isoler. Nous avons décrit leur récupation par lavage du tube de condensation au moyen d'alcool absolu. A cette occasion, nous avons noté que le mode opératoire permet déjà d'observer que des pigments aux belles teintes rouges, bleues et violettes restent aux niveaux les plus éloignés et qu'il est facile, de ce fait, de les éliminer.

Sur la liqueur alcoolique, nous avons dosé les 17-cétostéroïdes totaux en comparant nos résultats aux dosages pratiqués sans sublimation. Sur un même extrait urinaire nous avons obtenu des résultats en bon accord entre eux. En outre, nous avons noté que les réactions colorées sont beaucoup plus pures. Après sublimation, nous trouvons systématiquement des teneurs en 17-cétostéroïdes très légèrement supérieures à celles trouvées sur les mêmes extraits non soumis à la sublimation. Nous pensons que cela signifie précisément que la sublimation a permis d'élimner des impuretés susceptibles de donner une réaction de Zimmerman faussement positive.

Cette conception nous paraît être justifiée par la suite de nos recherches portant sur la chromatographie sur couche mince des extraits urinaires avant et après sublimation. Nous ne reviendrons pas sur la description des techniques utilisées qui permettent d'obtenir une bonne séparation des différents cétostéroïdes et, après densitométrie, d'apprécier les proportions relatives de chacun d'entre eux, d'où le nom de "stéroïdogramme" proposé par M^me^ Le Bourhis.

Le fait le plus marquant qui ressort de l'examen des stéroïdogrammes que nous avons établis est une amélioration de la séparation des différents stéroïdes dont la plupart ont été identifiés sur les chromatographies pratiquées avant et après sublimation : les pics sont mieux séparés, plus aigus. La superposition de deux stéroïdogrammes effectués sur le même extrait met très nettement en évidence l'élimination des substances parasites, de nature non stéroïde et susceptibles cependant de réagir comme telles.

En résumé, la sublimation des extraits urinaires mérite de prendre rang dans le domaine des techniques proposées pour purifier et mieux séparer les 17-cétostéroïdes d'importance biochimique. Comme telle, on peut la considérer comme présentant un progrès notable dans l'exploration du fonctionnement des principales glandes endocrines qui les secrètent (surrénales et gonades) ou qui les métabolisent (foie).

Vu, le Président du Jury
Professeur J.-C. DUMAZERT

Vu, le Doyen
Professeur Ch. GREBUS

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLEN W.H. — *J. Clin. End.*, 1950, 10, 71.
2. ALLEN W.H., HAYWARD S.T. et PINTO A. — *J. Clin. End.*, 1950, 10, 54.
3. BAGGETT B., ENGEL L.L. et FIELDING L.L. — *J. Biol. Chem.*, 1955, 213, 87.
4. BARTOS J. — *Ann. Pharm. Fr.*, 1959, 17, 141.
5. BITTO (Von B). — *Ann.*, 1892, 269, 377.
6. BONGIOVANNI A.M., EBERLEIN W.R. et THOMAS P.Z. — *J. Clin. End. and Métab.*, 1957, 17, 331.
7. BURSTEIN S. et LIEBERMANN S. — *J. Biol. Chem.*, 1958, 233, 331.
8. CAHEN R.I. et SALTER W.I. — *J. Biol. Chem.*, 1944,152,489.
9. CLYTON R.B. — *Biochemistry*, 1962, 1, 357.
10. COHEN S. et ONESON I.B. — *J. Biol. Chem.*, 1953, 204, 245.
11. COOPER J.A. et CREECH B.G. — *Anal. Biochem.*, 1961, 2, 502.
12. CORKER C.S., NORYMBERSKI J.K. et THOW R. — *Biochem. J.*, 1962, 83, 583.
13. CREPY O. et JAYLE M.F. — *Ann. Biol. Clin.* 1953, 11, 233.
14. DEMOLE E. — In Chromatographic revews, vol 4, p. 26, Elsevier Publ. Cie, Amsterdam N. Y.
15. DINGEMANSE E., HUIS IN'T VELD L.G. et HARTOG-KATS S.L. — *J. Clin. Endocr. and Métab.*, 1952, 12, 66.
16. DIRSCHERL W. et BREUER H. — *Zchr. Vitamin. Hormon. Ferment Forschr.*, 1954, 6, 287 (Vienne).
17. GARRIGUES J.C., TROPEA P.F., BOYER J., CODACCIONI J.L. et VAGUE J. — *Ann. Endocrinol., Paris*, 1963, 24, 870.
18. GIRARD A. et SADULESCO G. —*Helv. Chim. Acta*, 1936, 19, 1095.
19. GOBEL P., HENRI F. et ULRICH L. — *Endokrinologie*, 1959, 37, 65.
20. GORNALL A.G. et MAC DONALD M.P. — *J. Biol. Chem.*, 201, 279.
21. HAATI E.O.A., VANDEN HEUVEL W.J.A. et HORNING E.C. — *Anal. Chem.*, 1961, 2, 182.
22. HAAHTI E.O.A., VANDEN HEUVEL W.J.A. et HORNING E.C. — *Anal. Chem.*, 1961, 2, 344.
23. HENRY R. et THEVENET M. — *Bull. Soc., Chim. Biol.*, 1952, 34, 886.
24. HEYNS W. — In Chromatographie en phase gazeuse des stéroïdes hormonaux par SCHOLLER R. et JAYLE M.F., DUNOD ed., Paris 1967, p. 415.
25. HEYNS W., HENDRIKX A. and DE MOOR P. — *Acta Clin. Belg.*, 1964, 19, 346.
26. HOWARD J.A. et MARTIN A.J.P. — *Biochem. J.*, 1950, 46, 532.

27. JANOVSKY J.V. — *Ber.*, 1891, 24, 971.
28. JANOVSKY J.V. et ERB L. — *Ber.*, 1886, 19, 2155.
29. JAYLE M.F. — Analyse des stéroïdes hormonaux, t. 1 et 2, Masson ed., Paris 1962.
30. JAYLE M.F. et EMILIOZZI. — In Analyse des stéroïdes hormonaux T. I, Masson ed., Paris 1962.
31. JAYLE M.F., MALASSIS D. et SCHOLLER R. — In Analyse des stéroïdes hormonaux, T. 2, Masson ed., Paris 1962.
32. JONES J.K.N. et STITCH S.R. — *Biochem. J.*, 1963, 53, 679.
33. KATZENELLENBOGENE R., DOBRINER K. et KRITCHEVSKY T.H. — J. Biol. Chem., 1954, 207, 315.
34. KELLIE A.E., SMITH E.R. et WADE A.P. — *Biochem. J.*, 1953, 53, 578.
35. KIRSCHNER M.A. and LIPSETT M.B. — Stéroïds, 1964, 3, 277.
36. KNIGHTS B.A. et THOMAS G.H. — Nature, 1962, 194, 833.
37. KNIGHTS B.A. et THOMAS G.H. — Chem. and Ind., 1963, 1, 43.
38. LECHEVIN J.C., MALLEIN R., REVOL A. et BADINAND A. — Toulouse Pharm., 1961, 8, 41.
39. LE BOURHIS SAUER J. — Thèse de Médecine, Marseille, 1964.
40. LEDERER E. — Chromatographie en chimie organique et biologique, vol. 2, Masson Ed., Paris 1960.
41. LENNERT G., MUCKE W. and VALENTIN H. — Endokrinologie, 1964, 46, 241.
42. LIPSKY S.R. et LANDOWNE R.A. — *Anal. Chem.*, 1961, 33, 818.
43. LUUKRAINEN T., VANDEN HEUVEL W.J.A. et HORNING E.C. — *Biochem. Biophys. Acta*, 1962, 62, 153.
44. MATIN A.J.P. et SYNGE R.L.M. — *Biochem. J.*, 1941, 35, 138.
45. MUNDSON P.L., JONES M.E., MAC GALL J.P. et GALLAGHER T.F. — *J. Biol. Chem.*, 1947, 176, 72.
46. PESEZ M. — *Bull. Soc. Chim.*, 1958, p. 369.
47. PESEZ M. et BARTOS J. — Talanta, 1960, 5, 216.
48. PESEZ M. et HERBAIN M. — *Bull. Soc. Chim.*, 1948, p. 104.
49. PETERSON R.E. et PIERLE C.E. — Lipids and the steroids hormones in clinica Medecine. Sunderman F.W. et Lippincott Co. Publ. Philadelphia, 1960, p. 147.
50. PONTIUS D. — *Acta Endocrinol.*, 1955, 20, 19.
51. REISSERT A. — *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1904, 37, 831.
52. RIVERA R., DORFMAN R.I. and FORCHIELLI E. — *Acta Endocrinol.*, 1967, 54, 37.
53. SPARAGANA M., MASON W.B. et KEUTMANN E.H. — *Anal. Chem.*, 1962, 34, 1157.
54. SPARAGANA M., KEUTMANN E.H. et MASON E.H. — *Anal. Chem.*, 1963, 35, 1231.
55. STAHL E. — *Angew. Chem.*, 1961, 73, 646.
56. SWEELEY C.C. et HORNING E.C. — Nature, 1960, 187, 144.
57. TANSEY R.P. et CROSS J.M. — *J. Am. Pharm. Assoc., Sc. ed.*, 1950, 39, 660.
58. THOMAS B.S. and BULBROOK R.D. — *J. Chromatog.*, 1964, 14, 28.
59. UMBERGER E.J. — *Anal. Chem.*, 1955, 27, 768.
60. VANDEN HEUVEL W.J.A., HAAHTI E.O.A. et HORNING E.C. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 83, 1531.
61. VANDEN HEUVEL W.J.A., SWEELEY C.C. et HORNING E.C. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 3481.
62. WEICHSLBAUM T.E. et MARGRAF H.W. — *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1957, 17, 959.
63. WEINMANN S.H. et JAYLE M.F. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 65.
64. ZIMMERMANN W. — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, 233, 257.
65. ZIMMERMANN W. Vitamine and Hormone, 1944, 5, 1.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 15

I. — DONNEES CHIMIQUES SUR LES HORMONES STEROIDES 15

A) *Structure chimique des 17-cétostéroïdes* 15

B) *Structures particulières et réactions colorées* 18

a) *Généralités sur les réactions colorées utilisées dans la chimie analytique des hormones stéroïdes* 18

1. *Réactions de condensation* 19
2. *Réactions d'oxydation* 20
3. *Halochromie et halofluorie* 20

b) *Réactions colorées des 17-cétostéroïdes* 21
- *Dosage des 17-cétostéroïdes totaux* 21
- *Le dehydroepiandrosterone (DHA)* 22
- *Dosage de l'androsterone* 23

II. — HYDROLYSE DES FORMES CONJUGUEES D'ELIMINATION URINAIRE DES 17-CETOSTEROIDES 23

A) *Hydrolyse chimique* 24

a) *Action des acides minéraux forts* 24

b) *Solvolyse* 24

B) *Hydrolyse enzymatique* 25

a) *Les β glycuronidases* 25

b) *Les sulfatases* 25

III. — METHODES DE SEPARATION DES STEROIDES URINAIRES 26

A) *Séparations chimiques* 26

B) *Séparations chromatographiques des stéroïdes* 26

a) *Chromatographie sur colonne* 27
1. *Chromatographie liquide-liquide* 27
2. *Chromatographie solide-liquide* 27
3. *Chromatographie liquide-gaz* 28

b) *Chromatographie sur papier* 29

c) *Chromatographie en couches minces* 31

Pages

IV. — LA SUBLIMATION 32

V. — PHYSIOPATHOLOGIE DES 17-CETOSTEROIDES 33

A) *Métabolisme et catabolisme* 34
a) *Hormones d'origine surrénalienne* 34
b) *Hormones d'origine testiculaire* 35

B) *Pathologie de la surrénale et du testicule* 36

a) *La surrénale* 36
1. *Hypofonctionnement surrénalien* 36
2. *Hyperfonctionnement surrénalien* 36

b) *Le testicule* 37

C) *Variations de la 17-cétostéroïdurie à l'état normal et pathologique (explorations fonctionnelles)* 37

a) *Exploration dynamique par stimulation* 39
b) *Exploration dynamique par freinage* 39

OBJET DU TRAVAIL 41

RECHERCHES PERSONNELLES 43

Chapitre Premier. — Préparation des extraits urinaires 43

A) *Hydrolyse* 43

B) *Extraction des 17-cétostéroïdes* 43

Chapitre Deuxième. — La sublimation des 17-cétostéroïdes 45

A) *Appareillage* 45

B) *Sublimation des 17-cétostéroïdes urinaires* 46

Chapitre Troisième. — Dosage et chromatographie en couches minces des 17-cétostéroïdes urinaires avant et après sublimation 49

A) *Dosage colorimétrique des 17-cétostéroïdes* 49
1. *Méthode de dosage* 49
2. *Résultats* 50

B) *Chromatographie en couches minces des 17-cétostéroïdes* 51
1. *Technique de chromatographie* 51
2. *Comparaison des stéroïdogrammes urinaires* .. 51

CONCLUSIONS 55

BIBLIOGRAPHIE 59

Imprimerie Lino-Imp - Marseille